



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**La activación muscarínica estimula la
proliferación de células tumorales de mama
humana con participación de la óxido nítrico
sintasa.**

Nº 270

María Cristina Middonno

Tutor: Ricardo Bolaños

Departamento de Investigaciones
Noviembre 2009

A mi afectos, especialmente a mis padres

Índice

1.- Agradecimientos	5
2.- Introducción	6
2.1.- Proliferación celular	6
2.2.- Células neoplásicas	6
2.3.- Progresión tumoral	7
2.4.- Cáncer de mama	8
2.5.- Participación del sistema linfático	10
2.6.- Sistema nervioso periférico	10
2.7.- Receptores colinérgicos muscarínicos	11
3.- Hipótesis y Objetivos	13
3.1.- Objetivos específicos	13
4.- Materiales y Métodos	13
4.1.- Reactivos	13
4.1.1.- Reactivos generales.....	13
4.1.2.- Drogas de acción muscarínica.....	14
4.1.2.1.- Agonistas	14
4.1.2.2.- Antagonistas	14
4.1.3.- Inhibidores enzimáticos.....	14
4.1.4.- Buffers	14
4.1.5.- Anticuerpos	14
4.2.- Cultivos de líneas celulares.....	14
4.3.- Proliferación celular.....	14
4.4.- Inmunodetección de receptores colinérgicos muscarínicos.....	15
4.4.1.- Preparación de lisados celulares.....	15
4.4.2.- Ensayos de Western blot.....	15
4.5.- Actividad e inmunodetección de NOS	15
4.5.1.- Medición de concentración de nitrito	15
4.5.2.- Inmunodetección de óxido nítrico sintasa.....	15
4.6.- Estadística	16
5.- Resultados	16
5.1.- Proliferación celular	16
5.1.1.- Efecto del carbacol.....	16
5.1.2.- Efecto de bloqueantes muscarínicos e inhibidores enzimáticos.....	18
5.2.- Actividad e Inmunodetección de NOS	19
5.2.1.- Medición de la concentración de nitrito.....	19
5.2.1.1.- Efecto del carbacol	19
5.2.1.2.- Efecto de bloqueantes muscarínicos e inhibidores enzimáticos.....	19
5.2.2.- Expresión de isoformas de óxido nítrico sintasa	21
6.- Discusión	21
7.- Conclusiones	22
8.- Abreviaturas	23
9.- Bibliografía.....	23

1. Agradecimientos

En primer término a Male y a Gabriel por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por brindarse por completo, por la paciencia y el entrenamiento, por mejorar día a día mi formación y por desear que crezca junto a ellos.

A Male por la paciencia de estos últimos días, a Gabriel por el empuje del día a día.

A Laly y Laura por contarme sus experiencias y ayudarme con mis ensayos. A Alejandro porque a pesar de que casi no lo conozco, su trabajo me ayudó a encaminar el mío.

A todos los que trabajan en el Área de Investigaciones del Instituto Roffo: la Dra. Elisa Bal, la Dra. Lidia Puricelli. A María Adela Jasnís por aceptarme en el departamento de Inmunobiología. A todos mis compañeros.

A Ernesto por darme ánimo en mis días grises, a Lucas por guiarme y hacerme sentir como en casa, a Eduardo mi compañero de laboratorio por las noches.

A Ana Eijan y a la Dra. Silvia Kohan por sus consejos y apoyo.

A Ruth y a Jorge mis primeros amigos en el área de la Investigación. A Osvaldo mi compañero de estudios desde hace algunos años. A Catalina, Valeria, Gaby, Romina, Ximena, Guillermo por su buen trato.

A Gabriela Requejo una amiga que me contactó con Gabriel y Male.

A la Dra Berta Roth por darme la posibilidad de trabajar en el Instituto Roffo. Por alentar la actividad científica y fomentar la formación de cada una de las personas que trabajan con ella, cualquiera sea el ámbito en que se desempeñen.

A la Dra. Catalina Pogany, también por alentarme y estar siempre presente, por ser una gran amiga.

Al Dr. Ricardo Bolaños, quién aceptó ser mi tutor por parte de la Universidad de Belgrano. Por su guía.

A mi familia. A mi madre quién me heredó toda su energía y me contagió el querer “estar en todo y para todos”; a mi padre quién me enseñó el valor de silencio, la templanza, el sentido del deber y la perfección, todo eso casi sin palabras. A mis hermanos José y Leonardo por los consejos que sabemos intercambiar, por ser mis amigos.

A Guillermo con quién comparto hace ocho años mi vida. Por sus consejos desinteresados. Por haberme incentivado hace cinco años a retomar mis estudios. Por alentarme siempre para ser mejor persona y desear que me supere día a día. Por compartir mis ideales.

2. Introducción

2.1 Proliferación celular

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

Las células que proliferan están sujetas a una serie de etapas sucesivas, que constituyen el ciclo celular. Este es un proceso que consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M. La fase G1 es la etapa donde la célula prepara su maquinaria sintética para que la fase siguiente termine sin errores, antecede a la replicación del ADN y tiene una duración de 6 a 12 horas. Hay células que pueden detener su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante días, meses o años en estado de reposo sin aumento de masa, en lo que se ha denominado fase G0. En la fase G1 existe un punto de control llamado el punto de restricción R, en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para comenzar la síntesis de ADN y que la presencia de nutrientes, sales, factores de crecimiento y temperatura son adecuados. Es el punto de control más importante y los procesos oncogénicos modifican la regulación del ciclo celular principalmente mediante la alteración de la regulación de este punto de restricción (Bonfil 1998).

La existencia de puntos de control del ciclo celular es clave para la división celular y sirven de freno para asegurar que una fase no se inicie antes de que la anterior haya finalizado; además permiten el control del ciclo por señales externas. Distintos tipos de células diferenciadas en el organismo, sólo sintetizan las proteínas que necesitan para mantener su actividad, sin crecer ni dividirse a pesar de que las condiciones externas sean favorables. Este control riguroso del metabolismo celular permite adecuar crecimiento a división y se pierde en los procesos oncogénicos por alteración de la regulación de los puntos de restricción (Guyton 1998).

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

2.2 Células neoplásicas

El rasgo distintivo de las células neoplásicas es su capacidad de proliferación, que excede largamente a la de las células normales de la misma estirpe. El crecimiento de la masa neoplásica es consecuencia del desequilibrio entre la generación y la pérdida de células (Guyton 1998). Además de la falta de control en la división celular presentan otras múltiples anomalías, como crecimiento independiente del anclaje, capacidad de proliferar aún en ausencia de factores de crecimiento exógenos, pues han adquirido la capacidad de sintetizar sus propios factores, así como los receptores funcionales para ellos. Además, se han descrito alteraciones en las vías de señalización intracelulares; las células tumorales muestran una disminución o pérdida de respuesta a factores inhibitorios de crecimiento, que puede deberse tanto a una alteración en la síntesis de los mismos o de sus receptores como a defectos en los mecanismos de señalización desencadenados.

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

En los mecanismos de carcinogénesis están implicados principalmente dos tipos de genes: los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los primeros estimulan la proliferación descontrolada y por lo

tanto la malignización, son mutaciones de genes normales, los llamados protooncogenes involucrados en la regulación del crecimiento y división celular. Los genes supresores normalmente inhiben el crecimiento celular y suelen estar alterados en el cáncer perdiendo su función. Las mutaciones en estos dos tipos de genes alteran las vías de transducción de señales simulando una estimulación mitogénica continua e independizando así a la célula de la presencia de factores de crecimiento y de otros factores extracelulares.

Sólo una fracción pequeña de las células mutadas origina un tumor ya que la mayoría suele tener una capacidad de supervivencia menor que las células normales y mueren. Un número mínimo de estas células sobreviven y se convierten en tumorales, pero incluso la mayoría de éstas siguen teniendo controles de acción inhibitoria que impiden su proliferación, o son destruidas por el sistema inmune del hospedador antes de que conformen un tumor. Además para inducir la formación de un tumor es necesario que la célula inicial acumule un número indefinido de mutaciones (Haber 1997).

2.3 La progresión tumoral

El desarrollo de un tumor es un proceso que comienza con la aparición de alteraciones en una o varias células normales, cuyos genotipos mutan, lo que desencadena un programa de proliferación indebido. La posterior transformación maligna de una célula ocurre por acumulación de mutaciones en genes específicos que aportan ventajas selectivas para el crecimiento, invasión y establecimiento de las metástasis. Los tumores malignos consisten en múltiples poblaciones de células con diferentes patrones de expresión genética y por lo tanto, de diversidad bioquímica, inmunológica y biológica. Los distintos clones que se originan continuamente crecen hasta formar una pequeña masa tumoral de unos pocos milímetros que para seguir creciendo necesita el aporte de oxígeno y nutrientes que llegarán por la formación de vasos sanguíneos. Las células tumorales son capaces de migrar desde el tumor primario a sitios distantes y sobrevivir a una compleja serie de interacciones con los tejidos normales del hospedador, para dar origen a un foco metastásico. Todo este fenómeno se inicia cuando las células tumorales infiltran los tejidos adyacentes y luego penetran en cavidades corporales o en la circulación (Figura 1). Los pasos esenciales de la diseminación metastásica (Fidler 1978) son semejantes en todos los tumores:

Neovascularización: formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigan el tumor primario y permiten su diseminación posterior.

Invasión: algunas células tumorales pueden desprenderse del tumor primario, regulan negativamente la adhesión, aumentan su movilidad, invadiendo estructuras adyacentes como las membranas basales. La invasión del estroma del hospedador ocurre por la acción de enzimas secretadas tanto por las células tumorales como por las células del sistema inmune del hospedador.

Intravasación y entrada en la circulación: las paredes delgadas de los capilares y neovasos no ofrecen resistencia a la penetración de células tumorales, facilitada por las enzimas que se liberan para degradar la matriz extracelular y la membrana basal

Embolismo: son agregados que pueden ser sólo de células tumorales (homotípicos) o bien constituidos por células tumorales con plaquetas (heterotípicos).

Transporte: los agregados heterotípicos que se forman con fibrina protegen a las células tumorales del medio (flujo sanguíneo turbulento y fuerzas de rozamiento que provocan la muerte por lisis) y del sistema inmune del hospedador que dispara respuestas específicas e inespecíficas logrando una alta tasa de mortalidad de células tumorales circulantes.

Arresto: las células circulantes que sobreviven se arrestan en los lechos capilares de órganos distantes específicos para cada tipo de tumor (órgano blanco)

Adhesión: se produce la unión a células endoteliales del capilar o de membranas basales expuestas.

Extravasación: por similitud con los mecanismos que operan en la intravasación, los agregados de células tumorales extravasan al parénquima del órgano blanco.

Proliferación: las células tumorales que poseen receptores adecuados pueden responder a factores de crecimiento liberados por el órgano blanco y así proliferar en el parénquima de ese órgano.

Angiogénesis: las metástasis al igual que el tumor primario deben desarrollar una nueva red vascular.

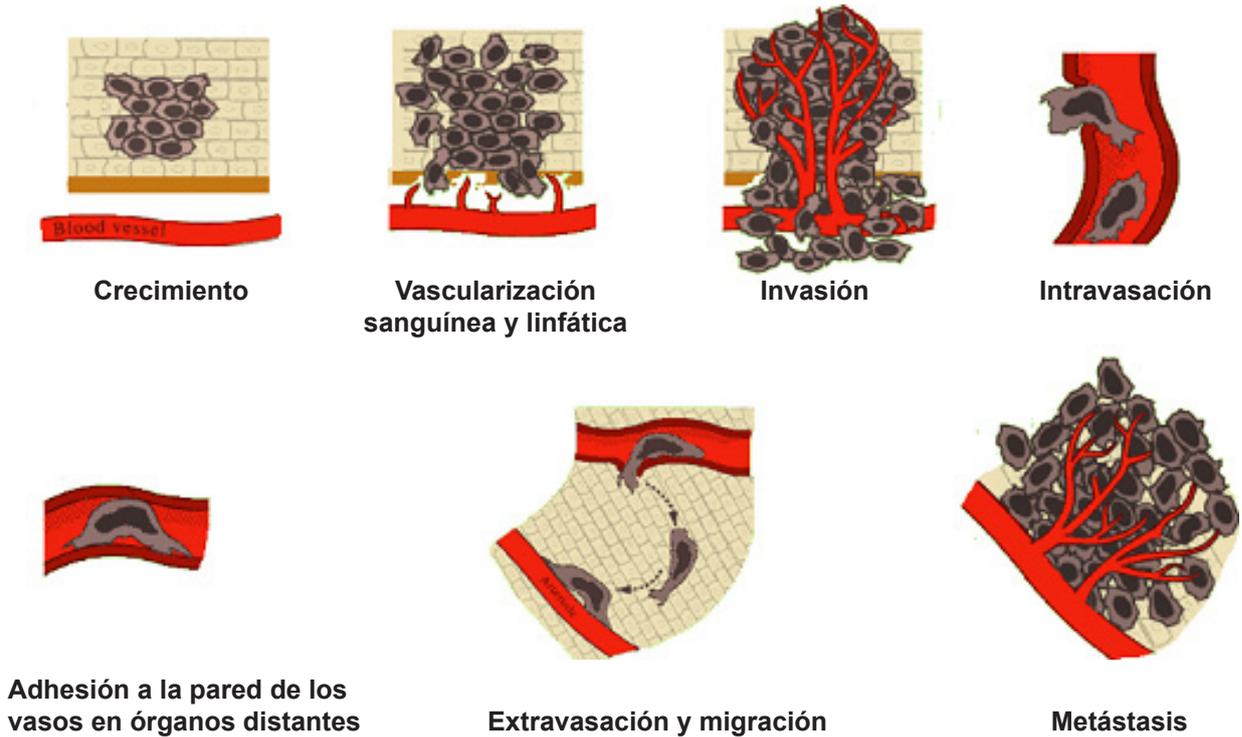


Figura 1: Etapas de la progresión tumoral

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

Las proteínas de la matriz extracelular del estroma del tumor, también pueden contribuir a este fenómeno al ejercer un efecto angiogénico directo o por proveer sustratos de adhesión para las células endoteliales infiltrantes. Esto determina que algunas de las células endoteliales de una vénula cercana se estimulen y comiencen a secretar el factor activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y metaloproteasas que lisan una porción de la membrana basal subendotelial que permite su extrusión, generando así una discontinuidad por la que otras células endoteliales migran a continuación de las primeras que actúan como guía hacia la masa tumoral. Esta migración, es acompañada por la proliferación de algunas células endoteliales por la acción de factores de crecimiento y continúa hasta que se forma un brote vascular que se ahueca y adquiere configuración tubular. Finalmente dos brotes vasculares funden sus terminaciones con lo que se forma un circuito por el cual puede circular sangre. Pericitos derivados de células de músculo liso arterial se posicionan en la membrana basal que recubre los nuevos capilares. Esta cobertura de pericitos dará lugar a la formación de músculo liso que rodea un nuevo capilar llevándolo a su maduración. Se formará por repetición toda una red vascular permitiendo que el tumor o la metástasis crezcan.

Por otra parte hay que considerar que hay tumores no invasivos que secretan bajos niveles de inductores de angiogénesis.

2.4 Cáncer de mama

La mama está compuesta por distintos tipos de tejidos que están circunscriptos por una membrana denominada fascia que se encuentra directamente debajo de la piel. La fascia profunda separa el tejido mamario de los músculos pectorales mayor y menor. Dentro de cada mama se distribuyen en forma radial aproximadamente 20 lóbulos que se subdividen en lobulillos, que terminan en acinos pequeños productores de leche. Los lóbulos, lobulillos y acinos se conectan con el pezón por una red compleja de ductos. Tanto el pezón como la areola tienen terminales nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos que drenan en los ganglios linfáticos axilares y de la cadena mamaria interna (NIH 1989).

La transformación maligna de células normales de mama genera células cuyo fenotipo puede ser positivo para G (capacidad de crecer), I (invasivo) y/o M (metastásico). Si el tipo celular transformado es glandular

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

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

2.5 Participación del sistema linfático

Los tumores de mama humanos metastatizan en pulmón, ganglios linfáticos, hígado, hueso o cerebro. Estas metástasis producen generalmente la muerte del portador y pueden aparecer muchos años después del tratamiento del tumor primario. La diseminación tumoral puede producirse por vía: a) hematológica; b) linfática y c) local (invasión). En particular los carcinomas se diseminan fundamentalmente por vía linfática hacia los ganglios drenantes siendo el ganglio centinela el primero en recibir el drenaje del tumor. Hay que considerar que los sistemas linfáticos y vasculares poseen numerosas conexiones que permiten que las células tumorales pasen rápidamente de un sistema a otro (Schirrmacher 1985).

Los vasos linfáticos difieren de los vasos sanguíneos por tener una membrana basal fenestrada, carecer de uniones interendoteliales estrechas y ser permeables a células y fluidos endoteliales. Los marcadores moleculares que pueden diferenciar vasos linfáticos de sanguíneos son críticos para el entendimiento de la formación de dichos vasos y su función y aún se encuentran en estudio. Recientemente se han identificado moléculas que regulan el desarrollo y crecimiento de vasos linfáticos: el factor de crecimiento del endotelio vascular C (VEGF-C) y el VEGF-D, que actúan vía receptores con actividad de tirosinas quinasas (VEGFR-3), la molécula LYVE-1 (homólogo de CD44) y la proteína Prox-1. Estas moléculas podrían ser usadas como marcadores de la linfoangiogénesis (Alitalo 2002).

2.6 Sistema Nervioso Periférico

El sistema nervioso puede dividirse anatómicamente en: Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC incluye las estructuras nerviosas del cerebro y de la médula espinal; el SNP incluye a todos los axones aferentes y eferentes del SNC y a las neuronas localizadas fuera de esas estructuras centrales. El SNP se divide a su vez en Sistema Nervioso Somático (SNS) y Sistema Nervioso Autónomo (SNA).

El SNS es voluntario e inerva exclusivamente al músculo esquelético, sus axones emergen del SNC y hacen sinapsis en las uniones neuromusculares, hay una única motoneurona que conecta al SNC con músculo esquelético.

El SNA regula funciones orgánicas esenciales para el desarrollo de la vida, como por ejemplo: la respiración, el funcionamiento vascular y cardíaco, las secreciones de glándulas endócrinas y exócrinas, la actividad del músculo liso, el metabolismo intermedio, la temperatura corporal, el control del sistema inmune, etc, (Figura 2). Consta de dos neuronas dispuestas en serie, la neurona preganglionar y postganglionar. En el SNA los axones luego de abandonar el SNC hacen sinapsis en neuronas periféricas formando los ganglios autónomos, los axones de éstas, a su vez, inervan a las células efectoras constituyendo las uniones neuroefectoras. El SNA consta además de tres divisiones anatómicas: el Sistema Nervioso Autónomo Simpático (SNAS), el Sistema Nervioso Autónomo Parasimpático (SNAP) y el Sistema Nervioso entérico formado por los plexos nerviosos intrínsecos del tracto gastrointestinal.

En el SNAS las sinapsis intermedias están situadas en los ganglios autónomos, que se encuentran fuera del SNC y están formados por las terminales nerviosas de las fibras preganglionares y los cuerpos celulares de las fibras postganglionares.

En el SNAP las células postganglionares se encuentran principalmente en los órganos blanco y los ganglios parasimpáticos como el ciliar y el esfenoopalatino se localizan en la cabeza y el cuello; en comparación con las neuronas del SNAS las fibras postganglionares son muy cortas.

El SNAS y el SNAP pueden producir efectos opuestos en algunos tejidos como el músculo cardíaco y el músculo liso del intestino y de la vejiga, mientras que en otros tejidos sólo tiene actividad una de las dos divisiones del SNA. En las glándulas sudoríparas, por ejemplo, y en la mayoría de los vasos sanguíneos sólo hay inervación simpática mientras que el músculo ciliar del ojo tiene inervación parasimpática.

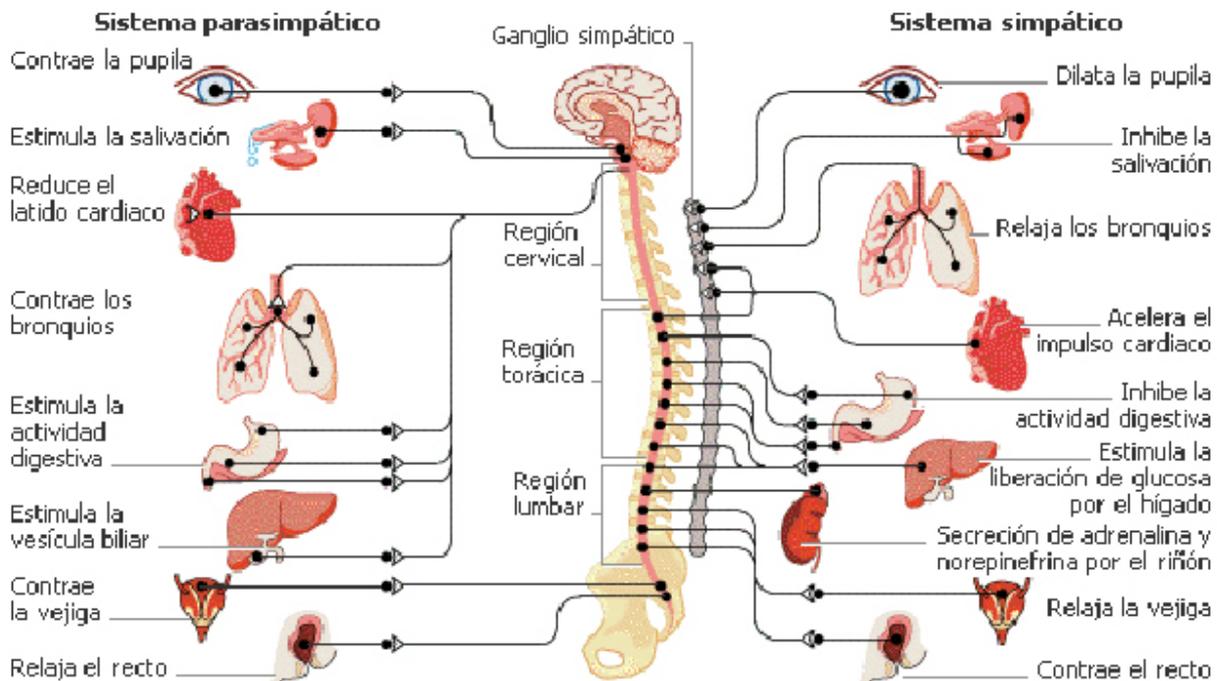


Figura 2: Funciones del sistema nervioso autónomo.

2.7 Receptores colinérgicos muscarínicos

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

Los RCM están ubicados en las terminales neuroefectoras postsinápticas del SNAP y tienen la capacidad de unir muscarina, un alcaloide producido por el hongo tóxico *Amanita muscaria* cuyo efecto es la estimulación de dichos receptores. Se ha demostrado que la respuesta colinérgica es variable según la naturaleza del tejido estudiado. Farmacológicamente se han descrito tres subtipos de RCM: M_1 , M_2 y M_3 . El M_1 o neuronal se une selectivamente al agonista oxotremorina y su antagonista selectivo es la pirenzepina (PIR). Estos receptores se encuentran principalmente localizados en el SNC, en las neuronas periféricas y en las células parietales gástricas. Funcionalmente median acciones excitatorias por disminución de la conductancia de K^+ que provoca la despolarización de la membrana y también estimulan la secreción de ácido gástrico. Los receptores M_2 o cardíacos abundan en el miocardio, pero también se localizan en las terminaciones presinápticas de las neuronas periféricas y centrales. Sus acciones son generalmente inhibitorias y se bloquean selectivamente con gallamina. Los receptores M_3 , localizados en glándulas y músculo liso producen, principalmente, efectos excitatorios: estimulación de las secreciones glandulares (salival, bronquial, sudorípara, etc.) y contracción del músculo liso visceral. También median la relajación del músculo liso, principalmente vascular, como resultado de la liberación de NO de las células endoteliales vecinas. El antagonista selectivo es el metabromuro de 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina (4-DAMP).

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

Los dominios citoplasmáticos del receptor son responsables del acoplamiento a la proteína G (Wess 1993). La misma está compuesta por 3 subunidades: α , β y γ . Durante la activación de los RCM, la proteína

G presenta modificaciones conformacionales que llevan al reemplazo del GDP por GTP. Este intercambio de nucleótidos de guanina disminuye la afinidad de la subunidad α por el complejo $\beta\gamma$ y el heterotrímero se disocia. La subunidad α unida a GTP y el dímero $\beta\gamma$ interaccionan entonces con distintos sistemas efectores, que incluyen a adenilil (AC) y guanilil ciclasa (GC), fosfodiesterasas, fosfolipasa A_2 (PLA_2), fosfolipasa C (PLC) y fosfatidil inositol 3-quinasas, activando o inhibiendo la producción de diversos segundos mensajeros como AMPc, GMPc, diacilglicerol (DAG), 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3), ácido araquidónico y ácido fosfatídico. También es sabido que la unión del agonista promueve la apertura de los canales de Ca^{2+} que a su vez activan diversas vías enzimáticas (Figura 3) (Marinissen 2001).

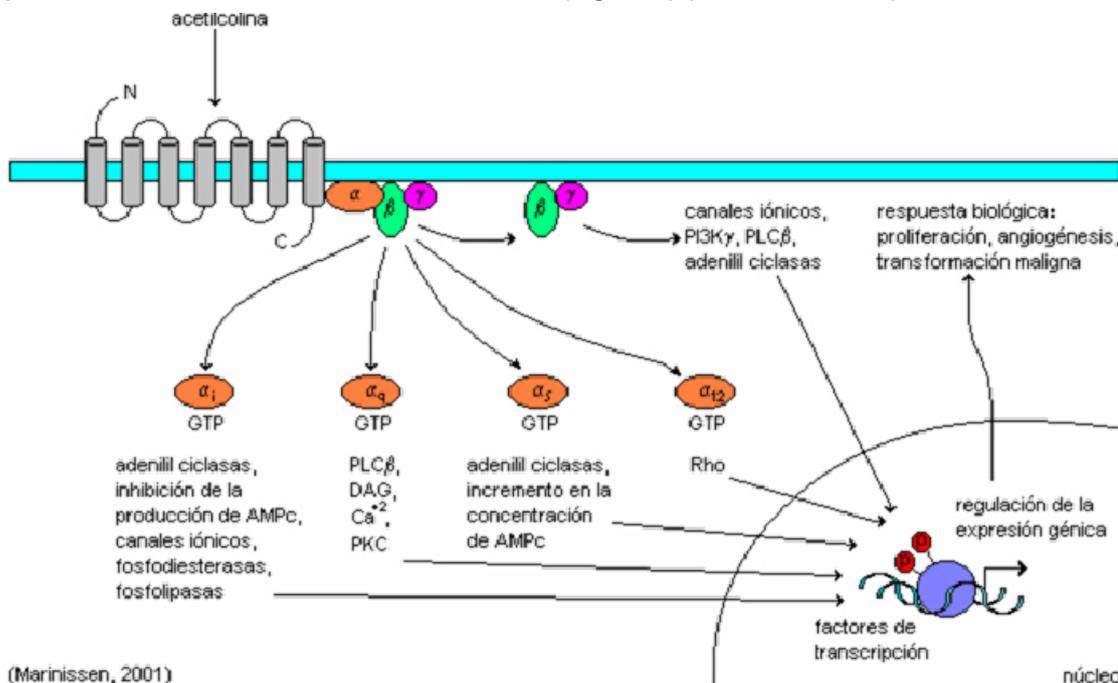


Figura 3: vías de señalización muscarínica. Abreviaturas: PLC β : fosfolipasa C β ; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinasa C, PI3K: quinasa de fosfatidil inositol.

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

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

Los agonistas muscarínicos pueden también activar a los receptores M_2 y M_4 . Estos subtipos clásicamente interactúan con un grupo de proteínas G_i produciendo la inhibición de la AC, la activación de los canales K^+ y la modulación de la actividad de los canales de Ca^{2+} en ciertos tipos celulares (Caulfield 1998; Matsui 2000).

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

3. Hipótesis y Objetivos

Considerando que la activación de los receptores acoplados a proteína G, como los de neurotransmisores, produce señales intracelulares que modulan la biología de las células tumorales, nos proponemos investigar la expresión y función de RCM en células tumorales de mama humana.

3.1 Objetivos específicos

Mediante ensayos in vitro en cultivos en monocapa de células de la línea MCF-7 nos proponemos:

- Caracterizar la expresión de RCM.
- Investigar la participación de los RCM en la proliferación celular.
- Identificar las enzimas efectoras de la activación muscarínica involucradas en dicho evento.

4. Materiales y Métodos

4.1 Reactivos

4.1.1 Reactivos generales

- Ácido clorhídrico (Merck).
- Acrilamida /bis acrilamida (Invitrogen)
- Albúmina (Sigma-Aldrich)
- Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)
- Azul Trypan (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$). (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato de p-toluidina - NBT/BCIP (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de potasio - KCl. (Merck)
- Cloruro de sodio - NaCl (Merck).
- Sulfato de cobre pentahidratada - $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (Anhedra)
- Deoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich)
- Dodecil sulfato de sodio - SDS (Sigma-Aldrich).
- Estándares de peso molecular (Bio Rad)
- Etilendiaminotetracético - EDTA (Merck).
- Folin – Ciocalteu reactivo. (Bio Rad)
- Glicina (Invitrogen)
- Hidróxido de Sodio (NaOH). (Merck)
- Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4),
- Medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco).
- Metanol (Biopack).
- Metilsulfato de fenazina (PMS) (Sigma-Aldrich)
- N-(1 naftil) etilendiamina.
- N, N, N', N'-Di-(dimetilamino) etano - TEMED (BioRad)
- Bicarbonato de sodio (Na_2CO_3) (Merck)
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4) (Merck),
- Nitrito de sodio - $NaNO_2$ (Merck).
- Persulfato de amonio. (ICN Biomedical)
- Rojo ponceau (Sigma-Aldrich)
- Sal de tetrazolio [3-(4.5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] (MTS). (Promega)
- Suero fetal bobino - SFB (Gibco).
- Sulfanilamida (Fluka)
- Tartrato de sodio y potasio (Merck).
- Tripsina (Gibco)
- Tris-Base (Invitrogen)
- Tritón X-100 (J.T. Baker)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)

4.1.2 Drogas de acción muscarínica

4.1.2.1 Agonistas

Cloruro de carbamilcolina (carbacol) (CARB) (Sigma-Aldrich)

4.1.2.2 Antagonistas

Atropina (AT), antagonista no selectivo, (Sigma-Aldrich)

Pirenzepina (PIR), antagonista selectivo del receptor M_{1_1} , metoctramina (MET), antagonista selectivo del receptor M_{2_1} , (Sigma-Aldrich)

Metabromuro de 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina (4-DAMP), antagonista selectivo del receptor M_{3_1} , (ICN Biomedicals)

4.1.3 Inhibidores enzimáticos

2-nitro-4-carboxifenil-N,N-difenilcarbamato (NCDC), inhibidor de PLC; N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA) bloqueante no selectivo de NOS; 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7), inhibidor de PKC (Sigma-Aldrich)

Inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina, fluoruro de p-metilsulfanilo (PMSF) (Sigma-Aldrich)

4.1.4 Buffers

Buffer de bloqueo (TBST): Tris-HCl 20 mM; NaCl 500 mM; Tween 20 0,05%; leche descremada 5%.

Buffer de transferencia: Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% (v/v); pH: 8,2.

Buffer de lisis: NaCl; Tris HCl 50 mM, pH 7.4; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM; Tritón X-100 1%; deoxicolato 1%; SDS 0,1%; leupeptina 5 ug/ml; aprotinina 5 ug/ml.

Buffer fosfato salino 10X: NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na_2HPO_4 1,44 g; KH_2PO_4 0,24 g; pH 7.2.

Buffer muestra: Tris-HCl 0,075 M; SDS 23%; azul de bromofenol 0,06%; pH: 6,8.

Buffer sustrato: Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, $MgCl_2$ 5 mM; pH: 9,5.

4.1.5 Anticuerpos

Policlonales contra los subtipos de RCM M_{1_1} - M_{4_1} obtenidos en cabra (Santa Cruz Biotechnology)

Policlonales contra el subtipo de RCM M_{5_1} (Santa Cruz Biotechnology)

Policlonales contra NOS 1 y NOS 3 obtenidos en conejo (Santa Cruz Biotechnology)

Policlonales contra NOS 2 obtenidos en conejo (Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpo IgG murina anti-cabra o anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich)

4.2 Cultivos de líneas celulares

Se utilizaron células tumorales de la línea MCF-7 derivada de un adenocarcinoma mamario humano provenientes de la colección de la Asociación Americana de Cultivo de Tejidos (ATCC). Se realizaron pasajes seriados de las mismas por despegado de monocapas confluentes con PBS o con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,02% en PBS libre de calcio y magnesio respectivamente, reemplazándose cada dos días el medio de cultivo (DMEM:F12) con 10% de SFB. La viabilidad celular se evaluó por el test de exclusión de azul Trypan y sólo se utilizaron suspensiones con una viabilidad mayor al 95 %. La ausencia de micoplasma se determinó por el método de Hoechst. (Chen1977)

4.3 Proliferación celular

Cuantificación de la actividad metabólica (método colorimétrico con MTS)

Se empleó un kit comercial basado en un método colorimétrico útil para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación (Cell Titer 96TM Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega). Consta de un compuesto tetrazolio (MTS o reactivo de Owen) y un reactivo que acopla electrones (PMS, metilsulfato de fenazina). El MTS es biorreducido por enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas a formazán soluble en medio de cultivo. La cantidad de este producto se mide en un espectrofotómetro a 490 nm y la absorbancia se considera proporcional al número de células vivas.

Las células MCF-7 se sembraron en placas de 96 pozos (10^4 células por pozo) en 100 μ l de DMEM:F12 con 10% de SFB. Se dejaron adherir a 37° C en atmósfera con 5% de CO_2 ; luego se privaron de SFB por 24 h. Se trataron con CARB durante 60 minutos en ausencia o en presencia de distintos antagonistas muscarínicos o inhibidores enzimáticos agregados 15 minutos antes que el CARB. Se desechó el sobrenadante y se incorporó medio fresco con SFB 5% en cada pozo. Las células se cultivaron por 48 h a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

Se descartaron los sobrenadantes. Se agregaron a cada pozo 100 μ l de medio sin suero y 20 μ l de MTS-PMS (20:1), luego de 2 h de incubación a 37°C en estufa, se midió la cantidad de formazán producido en un lector de ELISA computarizado (Bio Rad). Los resultados se expresaron como porcentaje de estimulación o inhibición respecto de la absorbancia basal (células sin tratamiento).

4.4 Inmunodetección de receptores colinérgicos muscarínicos

4.4.1 Preparación de lisados celulares

Las células MCF-7 (2×10^7) se cultivaron en placas de Petri de 100 mm de diámetro y luego de 2 lavados con PBS se lisaron en 1 ml del buffer de lisis (ver Buffers en esta misma sección). Los lisados se dejaron durante 30 minutos a 0°C, se sonicaron 30 segundos a 4°C y luego se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm. Por el método de Lowry (1971), se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes y éstos se conservaron a -80°C hasta su utilización.

4.4.2 Ensayos de Western blot

Las muestras obtenidas en el punto anterior se diluyeron 1:4 en buffer muestra (ver Buffers en esta misma sección) y se sembraron 30 μ g de proteína por calle en minigeles de SDS-PAGE al 7,5%. También se sembraron estándares de peso molecular conocido. Las muestras se sometieron a una electroforesis en las siguientes condiciones: 180 volts en un gel concentrador (Tris-HCl 0,125 M, SDS 0,1%, archilamida /bis acrilamida 13%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,1%; pH:6,8), y luego en un gel separador (Tris-HCl 0,375 M, SDS 0,1%, acrilamida /bis acrilamida 25%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,1%; pH:8,8) a 120 volts.

Luego de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas por el método líquido a una membrana de nitrocelulosa durante 35 minutos a 24 volts en buffer de transferencia (ver Buffers en esta misma sección).

Para verificar la eficiencia de la transferencia las membranas de nitrocelulosa se colorearon con rojo Ponceau. Después de varios lavados en agua bidestilada, las membranas se incubaron en buffer de bloqueo (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. El procedimiento anterior se realizó para bloquear los sitios inespecíficos de unión antes de agregar el primer anticuerpo. Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos específicos policlonales dirigidos contra los 5 subtipos de RCM (anti M₁-M₄ obtenidos en cabra y anti M₅ obtenido en conejo) diluidos 1:500 en TBST. Luego de 4 lavados de 10 minutos en TBST, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (IgG murina anti cabra o anti conejo según corresponda) conjugado con fosfatasa alcalina (diluido 1:4000 en TBST) durante 1 hora a 37°C. A continuación se realizaron 2 lavados en TBST y uno en buffer sustrato.

Las bandas se visualizaron con una solución de NBT/BCIP. Los pesos moleculares de las bandas proteicas se identificaron por comparación de sus Rf con los de estándares de peso molecular conocidos.

4.5 Actividad e Inmunodetección de NOS

4.5.1 Medición de la concentración de nitrito

La producción de NO se determinó como concentración de nitrito por el ensayo de Griess (Granger 1990). Las células (10^4) se sembraron por triplicado en 100 μ l de DMEM:F12 con 10% de SFB, una vez adheridas se reemplazó el medio por DMEM:F12 fresco deprivado de suero. A las 24 horas las células se trataron con CARB durante 60 minutos en ausencia o en presencia de diferentes antagonista o inhibidores enzimáticos agregados 15 minutos antes que el CARB, Después del tratamiento se descartaron los sobrenadantes y se agregó medio fresco. La concentración de nitrito se evaluó luego de 48 h por agregado de igual volumen del reactivo de Griess (1% sulfanilamina en 30% de ácido acético con 0,1% de N-(1 naftil) etilendiamina en 60% de ácido acético) a 50 μ l de los sobrenadantes de cultivos. Después de 15 minutos se midió la absorbancia a 540 nm con un lector de ELISA. La concentración de nitritos en las muestras se extrapoló de una curva estándar de NaNO₂ diluida en medio de cultivo. Los resultados se expresaron en micromoles de nitrito por millón de células (μ mol NO₂/10⁶ cél.).

4.5.2 Inmunodetección de óxido nítrico sintasa

Las células MCF-7 (5×10^6) se lisaron siguiendo la misma técnica descrita en el punto 4.1, las muestras obtenidas se diluyeron 1:4 en buffer muestra y se sembraron 30 μ g de proteína por calle en minigeles de SDS-PAGE al 7,5%. También se sembraron estándares de peso molecular conocido. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas por el método líquido a una membrana de nitrocelulosa. Después de varios lavados en agua bidestilada, las membranas se incubaron en buffer de bloqueo (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación. Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos específicos policlonales dirigidos contra las isoformas de NOS (anti NOS1 y anti NOS3 obtenidos en conejo y anti NOS2 obtenido en cabra) diluidos 1:100 en TBST. Luego de 4

lavados con TBST, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (IgG murina anti conejo o anti cabra según corresponda) conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1:4000 en TBST durante 1 hora a 37 °C. Las bandas se visualizaron con una solución de NBT/BCIP. Los pesos moleculares de las bandas proteicas se identificaron como se indica en el punto 4.1.

4.6 Estadística

Se utilizaron los análisis del test "t" de Student y ANOVA para determinar los niveles significación. Diferencias entre medias se consideraron significativas si $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Proliferación celular

5.1.1 Efecto del carbacol

Considerando que el SNAP puede regular múltiples funciones tanto en estados fisiológicos como patológicos investigamos el papel de la activación de los RCM en las células de adenocarcinoma mamario humano MCF-7. Para esto las células se trataron con el agonista muscarínico CARB. En la figura 4 se grafican las curvas concentración–respuesta del agonista sobre las células tumorales. Se observó un incremento significativo de la proliferación de las células MCF-7 dependiente de la concentración del agonista con respecto al basal. El efecto máximo (alrededor del 50%) se observó con concentraciones del agonista 10^{-9} - 10^{-8} M. El pretratamiento de las células con el antagonista muscarínico no selectivo AT (10^{-5} M) redujo significativamente el efecto del agonista en todas las concentraciones ensayadas. Los resultados se expresan en % respecto del control sin tratamiento.

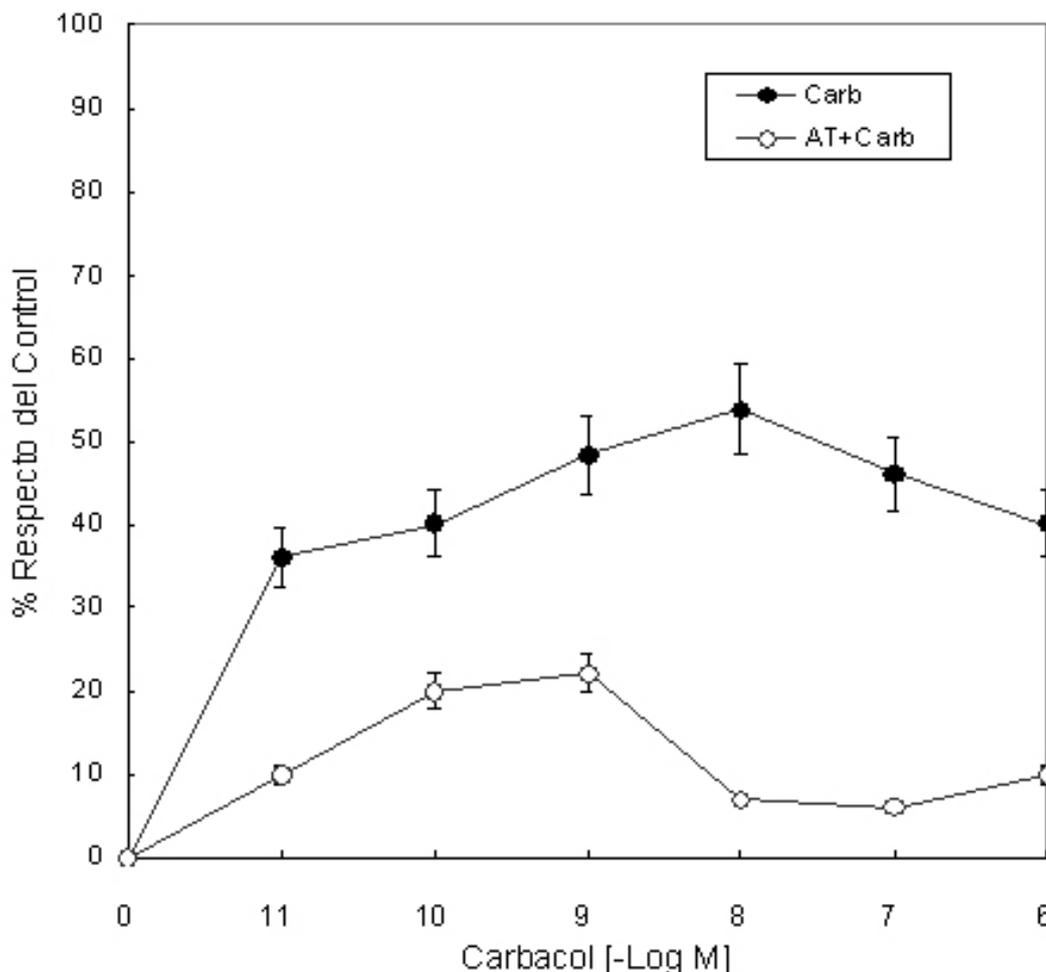


Figura 4: Ensayo de proliferación celular. Curva concentración respuesta de carbacol (CARB) en ausencia y en presencia de atropina (AT). Los valores son promedios \pm E.S. de 3 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$ respecto del basal.

Para identificar que subtipo de RCM está involucrado en el efecto proliferativo del CARB se realizaron las curvas concentración respuesta del agonista en ausencia o en presencia de los antagonistas selectivos de los receptores M₁ (PIR), M₂ (MET), M₃ (4-DAMP) agregados en una concentración 10⁻⁵ M.

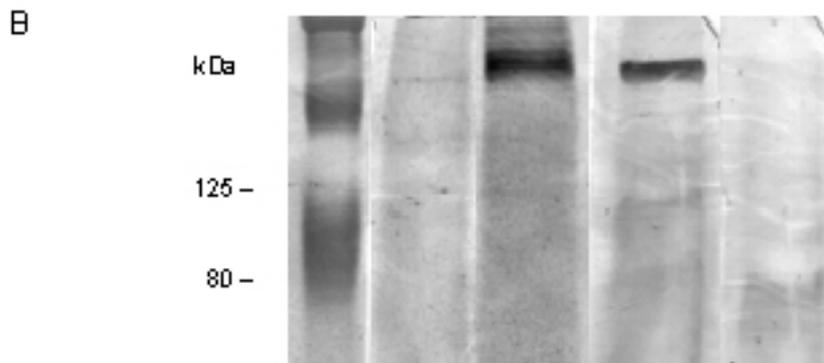
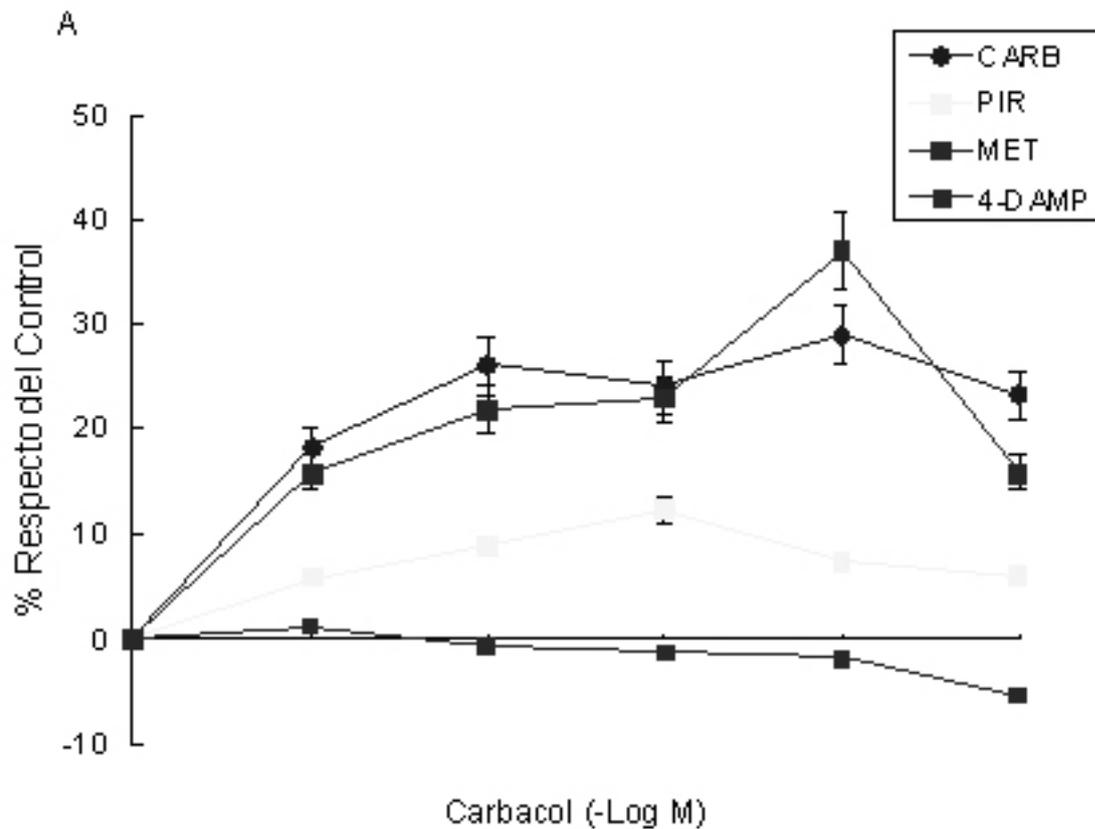


Figura 5: Receptores colinérgicos muscarínicos (M1–M5) en células MCF-7. A) Curva concentración respuesta de carbacol (CARB) en ausencia o en presencia de bloqueantes muscarínicos: pirenzepina (PIR), metoctramina (MET) y 4-DAMP. Los valores son promedio \pm E.S de 3 experimentos realizados por triplicado. B) Ensayo de Western Blot para caracterizar la expresión de receptores muscarínicos. Se muestra un ensayo representativo de 2 similares. Stds: estándares de peso molecular.

En la Figura 5A se observa que el efecto del agonista se reduce totalmente con el antagonista selectivo del receptor M₃, 4-DAMP y parcialmente con PIR, antagonista selectivo del receptor M₁. El agregado de MET, antagonista selectivo para el receptor M₂ no modificó significativamente el efecto estimulante del agonista. Por ensayos de Western blot se demostró una expresión mayoritaria de los subtipos M₃ y M₄. Mientras que se observaron niveles escasos de expresión de las proteínas M₁ y M₅ (Figura 5B). No se detectó expresión del subtipo M₂ en las células tumorales.

5.1.2 Efecto de bloqueantes muscarínicos e inhibidores enzimáticos

En la Figura 6A se muestra la dosis efectiva de CARB (10^{-9} M) para alcanzar el efecto proliferativo máximo en ausencia o en presencia de AT o de los antagonistas selectivos PIR, MET y 4-DAMP en una concentración 10^{-5} M. Se observa que el efecto estimulante del agonista (51 ± 5 %, $n=3$) se redujo significativamente con AT (7 ± 1 %, $n=3$) y con los antagonistas selectivos de los receptores M_3 ($-1,0 \pm 0,1$ %, $n=3$) y M_1 (10 ± 1 %, $n=3$). El tratamiento con el antagonista selectivo de receptores M_2 no modificó significativamente el efecto del agonista (40 ± 4 %, $n=3$).

Los receptores M_3 y M_1 se acoplan clásicamente a la activación de la enzima efectora PLC, que sintetiza fosfatos de inositol y diacilglicerol (DAG). Los primeros liberan el Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, aumentando la actividad de la enzima NOS. Asimismo el DAG activa a la enzima PKC. Demostramos la participación de PLC, PKC y NOS como enzimas efectoras de la transducción muscarínica pues el efecto estimulante del agonista (42 ± 3 %, $n=3$) se redujo significativamente al pretratar las células con NCDC (10^{-6} M), inhibidor selectivo de PLC (18 ± 1 %, $n=3$). Asimismo el agregado de H7 (5×10^{-5} M), inhibidor de la enzima PKC revirtió el efecto proliferativo ($-2,3 \pm 0,2$ %, $n=3$) y el tratamiento con L-NMMA (10^{-3} M) inhibidor no selectivo de NOS disminuyó significativamente el efecto de CARB ($3,8 \pm 0,3$ %, $n=3$), Figura 6B. Los resultados se expresan como % respecto del control.

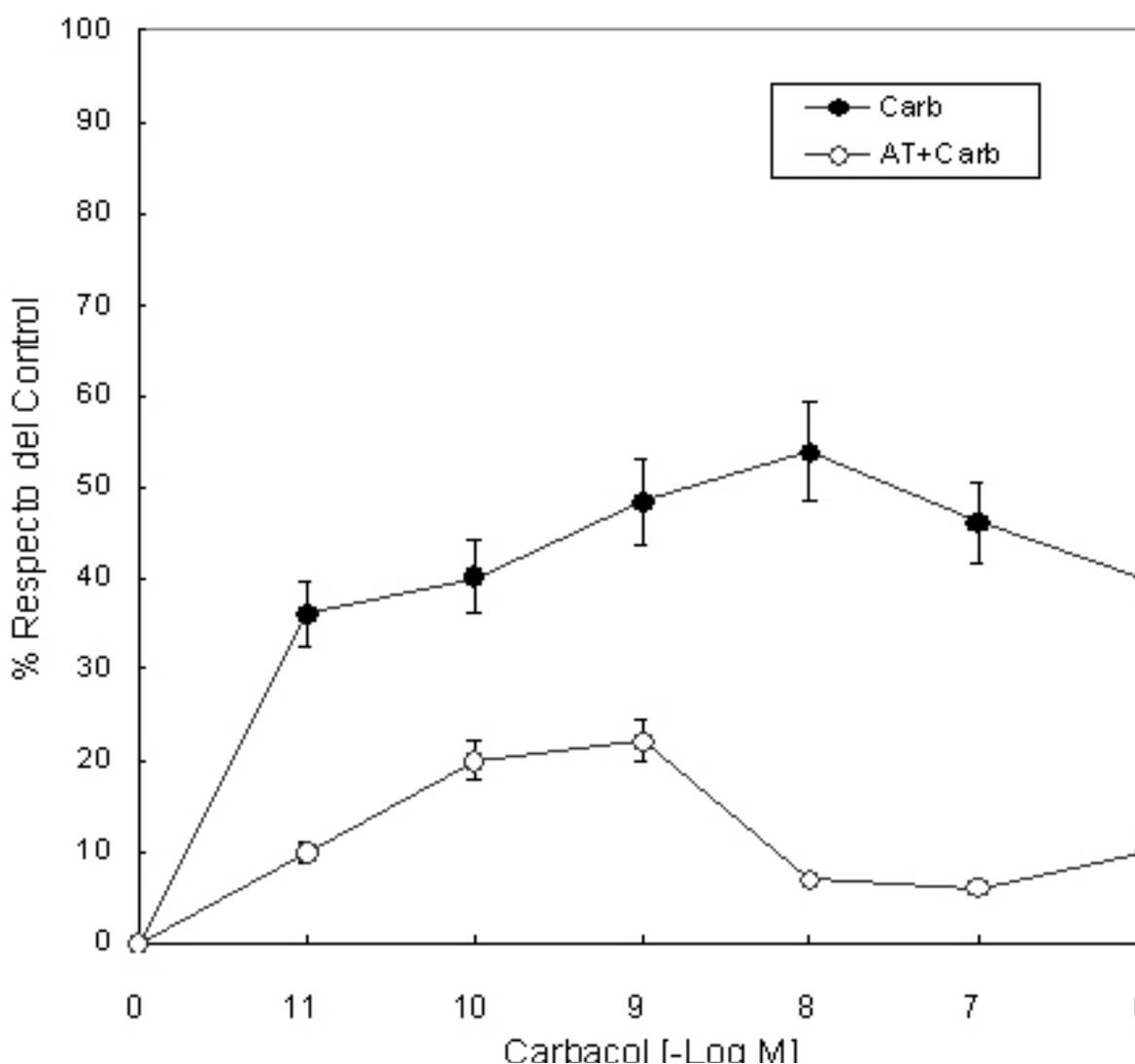


Figura 6: Ensayos de proliferación de células MCF-7 tratadas con carbacol, A) en ausencia y en presencia de bloqueantes muscarínicos: atropina (AT), pirenzepina (PIR); metoctramina (MET), 4-DAMP ; B) en células tratadas o no con inhibidores enzimáticos: 2-nitro-4-carboxifenil-N,N-difenilcarbamato (NCDC), H-7, NG-monometil-L-arginina (L-NMMA). Los valores son promedios \pm E.S. de 3 ensayos realizados por triplicado. * $p < 0,05$.

5.2 Actividad e Inmunodetección de NOS

5.2.1 Medición de la concentración de nitrito

5.2.1.1 Efecto del carbacol

La actividad de la enzima NOS se evaluó en los sobrenadantes de cultivo de las células MCF-7 determinando la producción de nitrito ($\mu\text{mol}/10^6$ cél) por el ensayo de Griess. El agregado de concentraciones crecientes de CARB incrementó significativamente la producción de nitrito con respecto al nivel basal, el efecto máximo se observó a la concentración 10^{-9} M. El pretratamiento con los antagonistas muscarínicos AT, PIR y 4-DAMP (10^{-5} M) redujo significativamente la producción de nitrito a todas las concentraciones ensayadas. Figura 7A.

5.2.1.2 Efecto de bloqueantes muscarínicos e inhibidores enzimáticos

Se investigó la producción de nitrito a la dosis efectiva máxima de CARB (10^{-9} M) en ausencia o en presencia de AT o de los antagonistas selectivos PIR y 4-DAMP (10^{-5} M). Se observó que la producción basal de nitrito ($1,76 \pm 0,09$, $n=3$) fue estimulada significativamente por el agonista ($4,59 \pm 0,23\%$, $n=3$). El efecto se revierte por el pretratamiento con AT ($2,91 \pm 0,15\%$, $n=3$) y con los antagonistas selectivos de los receptores M_3 ($2,42 \pm 0,12\%$, $n=3$) y M_1 ($3,01 \pm 0,15\%$, $n=3$) demostrando así su participación en la producción de NO inducida por CARB.

Ensayamos la reducción del efecto estimulante del CARB (10^{-9} M) sobre la producción de nitrito pretratando las células con los inhibidores enzimáticos de PLC, PKC y NOS para evaluar su intervención como enzimas efectoras en la cascada disparada por el agonista muscarínico. El efecto estimulante de CARB se redujo significativamente con el agregado de NCDC (10^{-6} M), inhibidor selectivo de PLC ($2,35 \pm 0,12\%$, $n=3$). Asimismo la producción de nitrito disminuyó por el pretratamiento con L-NMMA (10^{-3} M) inhibidor no selectivo de NOS ($2,57 \pm 0,13\%$, $n=3$). El tratamiento con H7 ($5 \cdot 10^{-5}$ M), inhibidor de la enzima PKC también disminuyó la producción de óxido nítrico ($3,26 \pm 0,16\%$, $n=3$). Se demuestra entonces, la participación de las tres enzimas en la transducción de la señal muscarínica. Figura 7B.

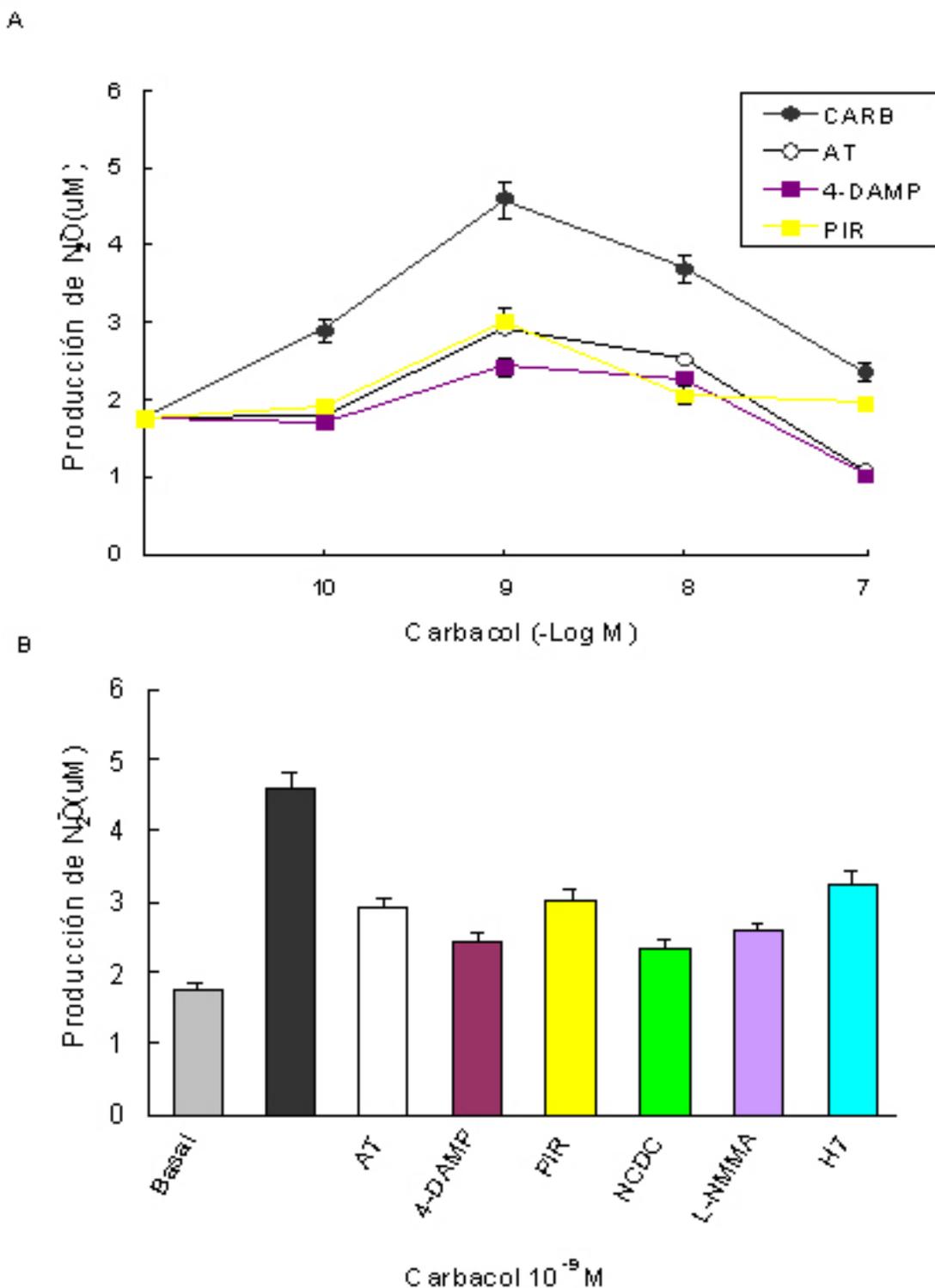


Figura 7. Producción de nitrito en células MCF-7. A) curva concentración-respuesta de carbacol en ausencia o en presencia de antagonistas muscarínicos atropina (AT), pirenzepina (PIR) y 4-DAMP. B) células tratadas con carbacol con o sin bloqueantes muscarínicos e inhibidores enzimáticos 2-nitro-4-carboxifenil-N,N-difenilcarbamato (NCDC), H-7, NG-monometil-L-arginina (L-NMMA). Los valores son promedios ± E.S. de 3 experimentos realizados por triplicado. *p<0,05 respecto del basal.

5.2.2 Expresión de isoformas de óxido nítrico sintasa

Por ensayos de Western blot investigamos la expresión de las isoformas de la enzima NOS. Se realizó la inmunomarcación con los anticuerpos específicos contra NOS 1, NOS 2 y NOS 3. Figura 8.

Se observa una banda de 145 kDa que corresponde a la inmunodetección de NOS1 y otra de 135 kDa identificada por el anticuerpo contra NOS3. No se observó inmunomarcación con el anticuerpo anti-NOS 2 indicando que dicha isoforma no se expresa en forma constitutiva en las células MCF-7.

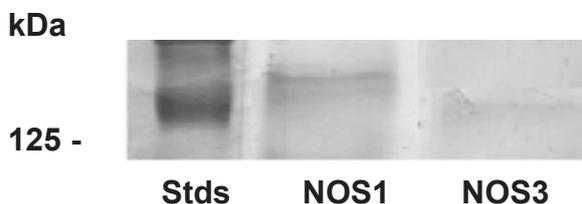


Figura 8. Ensayos de Western blot para identificar isoformas de NOS en las células tumorales de la línea MCF-7. Se muestra un ensayo representativo de 2 similares. Stds: estándares de peso molecular.

6. Discusión

La distribución diferencial de los distintos RCM así como su activación en distintos tipos de tejidos les permite modular la acción metabotrópica de la acetilcolina produciendo efectos biológicos reguladores como la contracción del músculo radial y circular en el ojo; el aumento de la contractilidad del músculo cardíaco; la contracción en el músculo liso bronquial y del tracto gastrointestinal así como la relajación de los esfínteres, el incremento de la secreción gástrica de ácido clorhídrico; la contracción del útero grávido y la erección del pene, entre otras funciones fisiológicas del organismo. Es conocido que los 5 subtipos de RCM (M_1 - M_5) coexisten en la mayoría de los tejidos y células y a causa de esta heterogeneidad se pueden regular funciones fisiológicas tan disímiles como la motilidad del músculo liso, la neurotransmisión y la contractilidad cardíaca.

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

Spoonster y col. (1997) evidenciaron que la activación, del receptor M_5 transfectado establemente en células CHO, con CARB revertía el fenotipo maligno de estas células con capacidad de diseminarse hacia un fenotipo fibroblástico no invasivo. Al estudiar la expresión y función de RCM en líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios murinos de aparición espontánea en ratones de la cepa BALB/c, obtenidas y caracterizadas en el Instituto Roffo (LM2, LM3 y LMM3) observamos que las mismas sobreexpresan RCM en comparación con células de la línea normal del epitelio mamario murino NMuMG (ATCC) (Español, 2002; 2004). Por ensayos de unión y saturación con el antagonista muscarínico tritiado bencilato de quinuclidinilo, así como por Western blot demostramos una expresión mayoritaria de los subtipos M_2 y M_4 en las células LM2 y LM3. Mientras que en las células de la línea LMM3, obtenida de un tumor mamario metastático (MM3) se observó un cambio hacia la sobreexpresión del receptor M_3 (Rimmaudo, 2005). Estos resultados son comparables a los observados por nosotros en las células MCF-7, las que también muestran una expresión significativa del mismo subtipo de receptor. Ye LH y col. (2006) han demostrado que la inoculación de células MCF-7 en ratones inmunosuprimidos SCID, permite detectar la presencia de un subclon de esta línea, con alta capacidad metastásica en pulmón denominado LM-MCF-7. Es probable que la expresión del subtipo M_3 de receptor esté relacionado con la capacidad metastásica de estas células. Resultados preliminares de nuestro laboratorio en los que caracterizamos la expresión de RCM en muestras quirúrgicas de pacientes con tumores de mama indican una expresión de los subtipos M_2 en tumores malignos no invasivos y M_3 , en tumores invasivos. Otros autores han encontrado una correlación entre los niveles de expresión del receptor M_3 y el grado de diferenciación de lesiones neoplásicas malignas en tejido prostático (Blanco y Robinson, 2004).

Jiménez y Montiel (2005) habían demostrado que los RCM expresados en células MCF-7 son funcionales, pues responden al agonista muscarínico CARB, el que estimula la proliferación de dichas células

por la vía ERK quinasa. Nosotros investigamos que subtipo de RCM se encuentra involucrado en este efecto proliferativo gatillado por el agonista muscarínico. Observamos que el efecto estimulante de CARB es revertido totalmente por AT y 4-DAMP, revelando la participación del subtipo M_3 . Es conocido que este subtipo de receptor modula acciones mitogénicas como ha sido descrito en células normales obtenidas de músculo liso de tejido traqueal bovino y de epitelio tiroideo de rata entre otros (Gosens 2003; Jiménez 2002) y tumorales de colon humano o mama murina (Frucht H, 1999; Español 2004). Los trabajos precedentes coinciden en que la activación del receptor M_3 promueve el incremento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} vía PLC. De igual forma evidenciamos la participación de esta enzima en el efecto proliferativo de CARB, pues el pretratamiento de las células MCF-7 con el inhibidor selectivo de PLC, NCDC, inhibe significativamente la estimulación producida por la dosis efectiva máxima del agonista.

Cabe destacar que el antagonista selectivo PIR inhibe parcialmente el efecto estimulante del CARB sobre la proliferación celular. Es probable que los receptores M_1 aún cuando se encuentran débilmente expresados en estas células, también participen del efecto proliferativo del CARB, ya que clásicamente comparten las mismas enzimas efectoras (Renuka 2004). Por otra parte es sabido que la PIR es un antagonista selectivo del receptor M_1 que también puede antagonizar, aunque con menor afinidad, la activación del receptor M_3 .

Es sabido que la activación de PLC que conduce a la hidrólisis de polifosfatos de inositol y produce un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular es un factor desencadenante de la activación de enzimas calcio dependientes como la NOS. Observamos que el efecto proliferativo de CARB es reducido por L-NMMA, inhibidor no selectivo de la enzima NOS. Asimismo el agregado de CARB en la misma concentración que produce el efecto máximo sobre la proliferación, estimuló la acumulación de NO_2^- en el sobrenadante de cultivo de las células MCF-7, efecto que es reducido por el pretratamiento de las células con 4-DAMP y PIR, confirmando la participación de NOS como enzima efectora de la señalización vía receptores M_3 y M_1 .

Por ensayos de Western blot se detectó la expresión de las isoformas calcio dependientes NOS1 y NOS3 en las células MCF-7; por otra parte no encontramos inmunoreactividad para la isoforma 2 de NOS. Está documentado que la producción de NO puede modular varias etapas de la progresión tumoral como el crecimiento, la migración y la angiogénesis (Wink 1998; Davel 2002a). La concentración de NO juega un papel muy importante para determinar el fenotipo y comportamiento biológico de una célula maligna (Davel 2002; Colasanti 2000). Si bien en la década del '90 numerosos autores asociaban el proceso de malignización con la expresión de NOS2, posteriormente se demostró que no sólo NOS2 está presente en los tumores sino también las isoformas calcio dependientes como NOS1 y NOS3 (Wink 1998; Jadeski 2000). NOS2 está involucrada en la estimulación de la migración de células tumorales, invasividad y angiogénesis, mientras que NOS1 se expresa en células metastásicas de melanoma, apoyando la idea de que las isoformas constitutivas pueden estar actuando en la malignidad (Ahmed 1999). En nuestro laboratorio se demostró que las isoformas 1 y 3 de NOS, que se expresan constitutivamente en células murinas LM3 y LM2 respectivamente, participan de la respuesta angiogénica inducida por dichas células tumorales (Davel 2004).

Observamos además que las células MCF-7 sobreexpresan también la proteína del receptor M_4 , que fuera descrito en el SNC donde media importantes funciones fisiológicas y patológicas, siendo su enzima efectora la AC (Tzavara 2004). Existen escasos antecedentes acerca de la expresión y función este receptor fuera del SNC. El mismo está presente en altas concentraciones en las líneas murinas LM2 y LM3, aunque aún no se conoce su función.

Es sabido que la enzima PKC actúa como un punto de "cross talk" entre distintas vías de señalización, regulando por fosforilación la actividad de diversas enzimas. En particular el pretratamiento de las células MCF-7 con H-7, un inhibidor de dicha enzima, reduce significativamente tanto el efecto proliferativo de CARB como la estimulación de los niveles de NO inducida por el agonista, evidenciando un mecanismo regulador positivo de PKC sobre NOS en estas células. Concordantemente en la línea tumoral de células de adenocarcinoma mamario murino LM3 se demostró que el efecto proliferativo del agonista CARB es también dependiente de la activación de PKC vía receptor M_3 . (Español 2004).

7. Conclusiones

Concluimos que las células MCF-7 derivadas de un adenocarcinoma mamario humano expresan RCM, fundamentalmente los subtipos M_3 y M_4 . La activación de estos receptores promueve la proliferación celular. La estimulación de la proliferación inducida por el agonista está mediada por receptores M_3 y M_1 que activarían a las enzimas PLC, PKC y NOS como efectoras de esta vía de transducción.

8. Abreviaturas

AC: adenilil ciclasa
AMPC: monofosfato cíclico de adenosina
AT: atropina
CARB: carbacol
COX: ciclooxigenasa
DAG: diacilglicerol
4-DAMP: metabromuro de 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina
GC: guanilil ciclasa
GMPC: monofosfato cíclico de guanidina
H-7: 1-(5-isoquinolinin, sulfonil)-2-metilpiperacina
IP₃: 1,4,5-trifosfato de inositol
L-NMMA: N^G-monometil-L-arginina
MET: metocetramina
MTS: sal de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]
NCDC: 2-nitro-4-carboxifenil-N,N-difenilcarbamato
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
PGE₂: prostaglandina E₂
PIR: pirenzepina
PKC: proteína quinasa C
PLA₂: fosfolipasa A₂
PLC: fosfolipasa C
PLD: fosfolipasa D
PMS: metilsulfato de fenazina
PMSF: fluoruro de p-metilsulfanilo
RAPG: receptores acoplados a proteína G
SNA: sistema nervioso autónomo
SNAP: sistema nervioso autónomo parasimpático
SNAS: sistema nervioso autónomo simpático
SNC: sistema nervioso central
SNS: sistema nervioso somático
TK: tirosina quinasa
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR: receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

9. Bibliografía

- Ahmed B and Van Den Oord J (1999). "Expression of the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) and its inhibitor, protein inhibitor of nNOS, in pigment cell lesions of the skin". *Br J Dermatol* 141: 12-19.
- Alitalo K and Makinen T (2002). "Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease". *Cancer Cell* 1: 219-227.
- Bennett M, Evan G and Schwartz S (1995). "Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques". *J Clin Invest* 95: 2266-2274.
- Bernabo J and Kazanietz M (1999). "Farmacología Molecular". Capítulo 20, pag 347-350.
- Blanco M and Robinson MJ (2004). "Muscarinic M3 acetylcholine receptor immunostaining in paraffin-embedded normal and neoplastic prostatic gland tissue. *Ann Diagn Pathol*: 8: 333-336.
- Bonfil R y Scharovsky O (1998). "Bases de oncología molecular". Ed Dunken. Cap: Apoptosis vs Inmortalidad celular. Pp 197-200.
- Bonner TI (1989). "The molecular basis of muscarinic receptor diversity". *Trends Neurosci* 12: 148-151.
- Caulfield M and Birdsall N (1998). «International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors». *Pharmacol Rev* 50: 279-290.
- Chen TR (1977). "In situ detection of micoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain". *Exp Cell Res* 104: 255-262.

- Colasanti M and Suzuki H (2000). "The dual personality of NO". Trends Pharmacol Sci 21: 249-252.
- Davel L and de Lustig ES (1993). "Cáncer y angiogénesis. La angiogénesis como terapia coadyuvante en Oncología". Tumor 6: 27-31.
- Davel L, Jasnias MA, de la Torre E, Gotoh T, Diamant M, Magenta G, Sacerdote de Lustig E, Sales ME (2002a). "Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced angiogenesis by macrophages". FEBS Lett 532: 216-220.
- Davel L, Eiján AM, Sales ME, Español A, D'Agostino A, Piccardo I, Lauria L, De Lustig ES, Jasnias MA (2002). "Reactivity of tumor-draining lymph nodes and the nitric oxide pathway". Int J Oncol 20: 59-67.
- Davel L, Rimmaudo L, Español A, de la Torre E, Jasnias M, Ribeiro M, Gotoh, T, Sacerdote de Lustig E, Sales ME (2004). "Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three adenocarcinoma cell lines". Angiogenesis 7: 45-51.
- Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Tabone E, Droz JP, Benahmed M (2003). "Growth regulatory factors and signalling proteins in testicular germ cell tumours". APMIS 111: 212-224; discussion 224.
- Español A, Eiján A, Mazzoni E, Davel L, Jasnias M, Sacerdote de Lustig E, Sales ME (2002). "Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines". Int J Mol Med 9: 651-657.
- Español A, and Sales ME (2004) "Different muscarinic receptors are involved in the proliferation of murine mammary adenocarcinoma cell lines". Int J Mol Med 13: 311-317.
- Fidler IJ (1978). "Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis". Cancer Res 38: 2651-2658.
- Frucht H, Jensen RT, Dexter D, Yang WL and Xiao Y (1999). "Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. Clin Cancer Res 9: 2532-2539.
- Gosens R, Bromhaar MM, Tonkes A, Schaafsma D, Zaagsma J, Nelemans SA, Meurs H (2004). "Muscarinic M(3) receptor-dependent regulation of airway smooth muscle contractile phenotype". Br J Pharmacol 141: 943-950.
- Granger D, Higgs J, Perfect J, Durack D (1990). "Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages". Clin Invest 85: 264-273.
- Guyton A y Hall J (1998). Tratado de fisiología médica. Editorial Interamericana. Cap.1, 3 y 60.
- Haber D and Harlow E (1997). "Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age". Nat Genet 16: 320-322.
- Jadeski L, Hum K, Chakraborty C, Lala P (2000). "Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis". Int J Cancer 86: 30-39.
- Jimenez E, Gamez MI, Bragado MJ, Montiel M (2002). "Muscarinic activation of mitogen-activated protein kinase in rat thyroid epithelial cells". Cell Signal 14: 665-672.
- Jimenez E and Montiel M (2005). "Activation of MAP kinase by muscarinic cholinergic receptors induces cell proliferation and protein synthesis in human breast cancer cells". J Cell Physiol 204: 678-686.
- Lowry O, Rosebrough N, Randall R and Farrar A (1971). "Protein measurement with Folin phenol reagents". J Biol Chem 193: 265-268.
- Marinissen M and Gutkind S (2001). "G-protein-coupled receptor and signaling networks: emerging paradigms". Trends Pharm Sci 22:368-376.
- Matos E, Loria D and Zengarini N (2003). "Atlas de Mortalidad por Cáncer en Argentina, 1997-2001". pp 12. Ministerio de Salud, Buenos Aires. Argentina.
- Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S, Taketo MM (2000). "Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype". Proc Natl Acad Sci U S A 97: 9579-9584.
- McKinney M and Richelson E (1989). "Muscarinic receptor regulation of cyclic GMP and eicosanoid production". The Muscarinic Receptors Brown J. Humana Press, Clifton N. Pp. 309-339.
- Nathanson N (2001). "A multiplicity of muscarinic mechanisms: Enough signaling pathways to take your breath away". Proc Natl Acad Sci USA 97: 6245-6247.
- Nicke B, Detjen K and Logsdon C (1999). "Muscarinic cholinergic receptors activates both inhibitory and stimulatory growth mechanisms in NIH3T3 cells". J Biol Chem 31: 21701-21706.
- NIH. National Cancer Institute (1989). "The breast cancer digest. A guide to medical care, emotional support, educational programs and Resources". U.S Department of Health, Education and Welfare. Pp 9-14.
- Ohara K, Uchiyama H, Ohara K, Haga T, Ichiyama A (1990). "Interaction of deglycosylated muscarinic receptors with ligands and G proteins". Eur J Pharmacol 189: 341-346.
- Pradier R, García Salas C, Kirchuk R y Loria D (2000). «Diagnóstico, tratamiento y seguimiento del

- cáncer. Pautas en Oncología». Instituto Angel H. Roffo. Tumores de mama pp 155-171.
- Puricelli L, Urtreger A, Vidal M, Lauría L, Daroqui C, Peters G, Adam A y Ranuncolo S (2001). "Actualización en oncología clínica. Módulo 11: Biología Celular". Asociación Argentina de Oncología Clínica. Universidad Católica de Salta. Pp 179.
 - Raedle J, Friedl W, Engels H, Koenig R, Trojan J, Zeuzem S (2001). "A de novo deletion of chromosome 5q causing familial adenomatous polyposis, dysmorphic features, and mild mental retardation". *Am J Gastroenterol* 96: 3016-3020.
 - Renuka TR, Ani DV, Paulose CS (2004). "Alterations in the muscarinic M1 and M3 receptor gene expression in the brain stem during pancreatic regeneration and insulin secretion in weanling rats. *Life Sci* 75: 2269-2280.
 - Rimmaudo L, de la Torre E, Sacerdote de Lustig E, Sales ME (2005). "Muscarinic receptors are involved in LMM3 tumor cells proliferation and angiogenesis". *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1359-1364.
 - Rosini P, Bonaccorsi L, Baldi E, Chiasserini C, Forti G, De Chiara G, Lucibello M, Mongiat M, Iozzo RV, Garaci E, Cozzolino F, Torcia MG (2002). "Androgen receptor expression induces FGF2, FGF-binding protein production, and FGF2 release in prostate carcinoma cells: role of FGF2 in growth, survival, and androgen receptor down-modulation". *Prostate* 53: 310-321.
 - Sagripanti J, Santa Coloma T and Calvo J (1984). "A simple computer program for Scatchard plot analysis of hormone receptors including statistical analysis on a low cost desk top calculator". *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 34: 45-53.
 - Schirmacher V (1985). "Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies". *Adv Cancer Res* 43: 1-73.
 - Spoonster J, Masiero L, Savage S, Probst J y Kohn E (1997). "Regulation of cell spreading during differentiation in the muscarinic M5 receptor tumor-suppressor model". *Int J Cancer* 72: 362-368.
 - Tzavara ET, Bymaster FP, Davis RJ, Wade MR, Perry KW, Wess J, McKinzie DL, Felder C, Nomikos GG (2004). "M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related CNS pathologies". *The FASEB Journal* 18: 1410-1412.
 - Van Koppen C and Nathanson N (1990). "Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function". *J Biol Chem* 265: 20887-20892.
 - Wess J (1993). "Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand/receptor/G protein interactions". *Life Sci* 53: 1447-1463.
 - Wess J (1996). "Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors". *Crit Rev Neurobiol* 10: 69-99.
 - Wink D, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst M and Mitchell J (1998). "The multifaceted roles of nitric oxide in cancer". *Carcinogenesis* 19: 711-721.
 - Ye LH, Wu LY, Guo W, Ma HT, Zhang XD (2006). "Screening of a sub-clone of human breast cancer cells with high metastasis potential". *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 86: 61-65.

