Efecto quimioterapéutico de un agente liberador de óxido nítrico contra el cáncer de vejiga.

Miriam Nohemí López Martínez

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Septiembre 2024

Efecto quimioterapéutico de un agente liberador de óxido nítrico contra el cáncer de vejiga.

Tribunal:

Dra. Ileana Corvo

Dra. Andrea Medeiros

Dra. Cecilia Saiz

Dra. Paola Hernández, Directora

Dra. Gloria Virginia López, Directora

DEDICATORIA

A mis padres, Jaime y María del Carmen, quienes me han guiado con su amor, paciencia y sacrificios desde el principio de mi vida. Gracias por enseñarme con su ejemplo el valor del esfuerzo y la perseverancia, por su confianza en cada paso que he dado y por creer en mí incluso en los momentos en que dudé de mí misma. Su amor y apoyo incondicional ha sido el pilar de todo lo que he logrado. Este logro es para ustedes.

A mi hermana, mi confidente y amiga incondicional. Gracias por estar siempre a mi lado, por tu apoyo incondicional y por hacerme sentir que no estoy sola en los momentos difíciles. Siempre has sido un pilar fundamental en mi vida, nuestra conexión y tu apoyo inquebrantable a través de la distancia me han dado la fortaleza para seguir adelante.

A mi esposo, mi compañero de vida. Gracias por acompañarme en el camino, por tu amor incondicional y por ser mi refugio en los momentos de incertidumbre. Gracias por tus palabras de aliento y tu comprensión en los momentos difíciles. Este logro es tan tuyo como mío, pues has sido mi sostén, mi fuente de fortaleza y motivación cuando más lo he necesitado. Gracias por apoyarme a perseguir mis sueños, te amo.

Una dedicatoria especial a mis abuelos, en especial a mi abuelito Beny, su partida ha sido difícil, pero su recuerdo me acompaña. La vida no les permitió ver culminado este logro, pero sus consejos y enseñanzas resuenan en mi corazón todos los días.

A Dios, gracias infinitas por haberme permitido culminar esta etapa tan importante de mi vida académica. Que tu sabiduría y tu espíritu continúen guiando cada uno de mis pasos, iluminando mi camino y dándome fortaleza para enfrentar los nuevos desafíos que vendrán.

“Todo lo que hagan, háganlo con amor”

1 Corintios 16:14

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado del esfuerzo y la colaboración de muchas personas que han sido fundamentales en mi formación académica a lo largo de estos años. A todas ellas, mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, Dras. Paola Hernández y Virginia López. Gracias por darme la oportunidad que tanto estaba buscando, por su guía constante, su paciencia, dedicación y, sobre todo, por la confianza depositada en mí para poder llevar a cabo este proyecto. Sus valiosas enseñanzas y su apoyo incondicional han sido esenciales en mi crecimiento y formación académica. Cada sugerencia, corrección y cada intercambio de ideas me han ayudado a mejorar a lo largo de este proceso. Me han enseñado no solo el rigor científico que requiere la investigación, sino también la importancia de la perseverancia y el trabajo en equipo. Agradezco enormemente el tiempo que han invertido en mi formación y por haberme dado la confianza y libertad para explorar mis propios intereses en el marco de la investigación. Este proyecto no habría sido posible sin su apoyo continuo, gracias por su tiempo, sabiduría y dedicación.

Un agradecimiento muy especial a todos los que han colaborado para el desarrollo de este trabajo. A Marina, Viro y Tiago, gracias por recibirme siempre con alegría en el laboratorio y brindarme siempre su ayuda en todo lo que necesité. Su disposición y buen ánimo han hecho de esta experiencia algo mucho más enriquecedor.

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. María Laura Lavaggi por orientarme hacia la persona indicada, por su apoyo y el de su equipo de trabajo en el Laboratorio de Química Biológica Ambiental del Centro Universitario Regional Noreste, Sede Rivera durante mi instancia de trabajo.

Quiero agradecer también a la Dra. Mariela Bollati y Paula Cespedes, de la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur, por su ayuda en la realización de los ensayos de ciclo celular y apoptosis. Su colaboración ha sido muy valiosa para poder avanzar en este proyecto.

Agradezco sinceramente a la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación de la Facultad de Medicina (URBE), al Dr. Martín Breijo, Marcelo Fernández, Florencia, Mariela, Diana, Rocha y a todo el personal, por su disposición para trabajar con nosotras.

Su apoyo fue esencial para el desarrollo del modelo murino de cáncer de vejiga. Gracias Marcelo por compartirme sus conocimientos, agradezco la paciencia y dedicación para enseñarme la técnica de instilación, fue uno de los retos más grandes que tuve que enfrentar en el desarrollo de este proyecto, la cual se volvió una de las mejores experiencias, muy bonita y sobre todo enriquecedora para mi formación.

Al Dr. Eduardo Savio, Laura Reyes y Manuela Bentura del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), gracias por su colaboración en la realización de los estudios de imagen por Resonancia Magnética. Su experiencia y apoyo fueron fundamentales para llevar a cabo esta parte del proyecto.

A la Dra. Jimena Hochmann, mi más sincero agradecimiento por su ayuda en el escaneo de las muestras histológicas de mis estudios. Aprecio profundamente el tiempo y el apoyo técnico brindado para digitalizar mis muestras.

A las compañeras de laboratorio, Laura Lafon, Daniela Olsson y Valentina Perini por su apoyo y amistad, gracias por los ánimos para seguir adelante. Un agradecimiento especial a Valentina por ayudarme a realizar los ensayos cometa, gracias por tu dedicación y compartir conmigo la técnica. Estoy profundamente agradecida de haber coincidido con ustedes en este camino académico.

Finalmente, agradezco con todo mi corazón a toda mi familia y mis amigos “Uru-Méx”. Un agradecimiento especial a mi prima, Dra. Cynthia Montoya por la ayuda con la histología. A pesar de la distancia, su cariño, palabras de aliento y apoyo constante han sido de suma importancia para mi bienestar emocional durante todo este proceso. Gracias por creer en mí, por celebrar cada uno de mis logros y por darme ánimos para seguir adelante cuando las cosas parecían difíciles.

Este logro no solo es mío, sino de todos ustedes. A cada uno, mi más profundo agradecimiento.

Efecto quimioterapéutico de un agente liberador de óxido nítrico contra el cáncer de vejiga.

Miriam N. López Martínez

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de la República

2024

Directoras: Dras. Paola Hernandez y Virginia López

Facultad de Química, Universidad de la República

El cáncer de vejiga es una enfermedad prevalente del tracto genitourinario y constituye uno de los tipos de cáncer más comunes en hombres, con una alta tasa de morbilidad y mortalidad, además de generar elevados costos económicos. Su etiología está principalmente asociada a factores ambientales, nutricionales y ocupacionales, siendo el consumo de cigarrillos el factor de riesgo más importante. Los mecanismos subyacentes a la tumorigénesis y progresión del cáncer de vejiga son responsables de su alta propensión a la recurrencia, resistencia a la quimioterapia y metástasis vesical. A pesar de los avances en cirugía, quimioterapia y radioterapia, no se ha logrado una reducción significativa en la recurrencia ni en la mortalidad de esta enfermedad, lo que resalta la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos.

Entre los compuestos emergentes con potencial terapéutico, los agentes liberadores de óxido nítrico (·NO) destacan por su capacidad para modular proteínas clave involucradas en la proliferación tumoral, metástasis, mecanismos antiapoptóticos y resistencia a la quimioterapia. Estos compuestos representan una estrategia prometedora para inducir apoptosis en las células cancerosas de vejiga, reducir la recurrencia y mejorar la eficacia del tratamiento convencional.

Nuestro grupo de investigación ha identificado a **MV14**, un compuesto liberador de ·NO, como una molécula líder con actividad antiproliferativa frente a células de cáncer de vejiga. El objetivo de este proyecto de maestría fue investigar el mecanismo de acción de **MV14** y evaluar su efecto antitumoral en un modelo in vivo. Para ello, se utilizaron las

líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga T24 y 253J, así como una línea celular no cancerígena derivada de urotelio, SV-HUC-1. Se determinaron las concentraciones de CI_{50} y el índice de selectividad (IS) en comparación con la línea celular no cancerígena, evaluando además el efecto genotóxico de **MV14** y su capacidad para sensibilizar a las células cancerosas en combinación con cisplatino, con el objetivo de reducir la dosis de quimioterapia y aumentar la eficacia del tratamiento. Asimismo, se investigaron la inhibición del ciclo celular, la inducción de apoptosis, la inhibición de la migración celular y la capacidad de inhibir la expresión de survivina, una proteína clave en la progresión del cáncer de vejiga. Adicionalmente, se realizaron estudios fisicoquímicos para evaluar la capacidad de **MV14** de liberar óxido nítrico, su estabilidad y su perfil lipofílico, junto con pruebas de mutagenicidad mediante el test de AMES, lo que permitió avanzar hacia estudios *in vivo* en un modelo murino de cáncer de vejiga.

Los resultados preliminares obtenidos en este modelo sugieren que **MV14** es una molécula líder prometedora con potencial antitumoral. No obstante, se requieren estudios adicionales para confirmar su eficacia en el modelo animal y profundizar en sus mecanismos de acción.

Chemotherapeutic Effect of a Nitric Oxide-Releasing Agent Against Bladder Cancer

Miriam N. López Martínez

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química Universidad de la República

2024

Directors: Dras. Paola Hernandez y Virginia López

Facultad de Química, Universidad de la República

Bladder cancer is a prevalent disease of the genitourinary tract and represents one of the most common types of cancer in men, with a high rate of morbidity and mortality, as well as generating significant economic costs. Its etiology is mainly associated with environmental, nutritional, and occupational factors, with cigarette smoking being the most important risk factor. The underlying mechanisms of bladder cancer tumorigenesis and progression are responsible for its high propensity for recurrence, chemotherapy resistance, and bladder metastasis. Despite advances in surgery, chemotherapy, and radiotherapy, there has been no significant reduction in the recurrence or mortality of this disease, highlighting the need to develop new therapeutic agents.

Among the emerging compounds with therapeutic potential, nitric oxide (·NO) donors stand out for their ability to modulate key proteins involved in tumor proliferation, metastasis, anti-apoptotic mechanisms, and chemotherapy resistance. These compounds represent a promising strategy to induce apoptosis in bladder cancer cells, reduce recurrence, and improve the efficacy of conventional treatment.

Our research group has identified **MV14**, a ·NO-releasing compound, as a lead molecule with antiproliferative activity against bladder cancer cells. The aim of this master's project was to investigate the mechanism of action of **MV14** and evaluate its antitumor effect in an *in vivo* model. For this purpose, the bladder cancer cell lines T24 and 253J, as well as a non-cancerous urothelial cell line, were used. The IC_{50} concentrations and selectivity index (SI) were determined in comparison with the non-cancerous cell line. Additionally, the genotoxic effect of **MV14** and its ability to sensitize cancer cells in

combination with cisplatin were evaluated, aiming to reduce the dose of chemotherapy and enhance treatment efficacy. Moreover, the inhibition of the cell cycle, induction of apoptosis, inhibition of cell migration, and the ability to suppress the expression of survivin, a key protein in bladder cancer progression, were investigated. Physicochemical studies were also conducted to evaluate the NO-releasing capacity, stability, and lipophilicity of **MV14**, along with mutagenicity testing using the AMES test, allowing us to advance towards *in vivo* studies in a murine bladder cancer model.

The preliminary results obtained in this model suggest that **MV14** is a promising lead molecule with antitumor potential. However, further studies are required to confirm its efficacy in the animal model and to deepen our understanding of its mechanisms of action.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción ……..1
   1.1. Generalidades. ……...1
   1.2. Epidemiología a nivel mundial/nacional. ……..2
   1.3. Descripción de la enfermedad. ……..7
      1.3.1. Fisiopatología de la enfermedad. ……...8
      1.3.2. Presentación clínica y diagnóstico de la enfermedad. ……9
   1.4. Tratamientos para el cáncer de vejiga. ……11
      1.4.1. Tratamientos para el cáncer de vejiga No Músculo-Invasivo (CVNMI). ...……11
      1.4.2. Tratamientos para el cáncer de vejiga Músculo-Invasivo (CVMI)……15
   1.5. Importancia del óxido nítrico y la relevancia de los nuevos compuestos liberadores de óxido nítrico en el tratamiento del cáncer de vejiga. ……17
   1.6. Vía NF-κB. ……..21
   1.7. Survivina. ……25
2. Hipótesis. ……29
3. Objetivos. ……29
   3.1. Objetivo general. ……29
   3.2. Objetivos específicos. ……29
4. Metodología. ……...30
   4.1. Síntesis química. ……30
   4.2. Estudios fisicoquímicos. ……31
      4.2.1. Estudios de estabilidad y lipofilia……31
      4.2.2. Liberación de óxido nítrico. ……31
   4.3. Citotoxicidad por MTT. ……..32
      4.3.1. Citotoxicidad en células derivadas de cáncer de vejiga T24 y 253J……..32
      4.3.2. Citotoxicidad en células derivadas de urotelio SV-HUC-1…….33
   4.4. Índice de selectividad. ……..……...33
   4.5. Evaluación del efecto quimiosensibilizador. ……...34
   4.6. Estudios de ciclo celular. ……34
   4.7. Inducción de la apoptosis celular. ……35

4.8. Determinación del efecto genotóxico. ……36
4.8.1. Inmunocitoquímica γ-H2AX. ……36
4.8.2. Ensayo cometa. ……...37
4.9. Ensayos de migración celular. ……38
4.10. Estudios de la expresión de survivina. ……39
4.11. Determinación del efecto mutagénico. ……40
4.12. Actividad antitumoral *in vivo*. ……41
4.12.1. Desarrollo del modelo de cáncer de vejiga murino y tratamiento intravesical con el compuesto **MV14**. ……41
4.12.2. Estudios de imagen por Resonancia Magnética (MRI). ……...42
4.12.3. Análisis de orina. ……42
4.12.4. Cuantificación de células sanguíneas mediante biometría hemática. ……43
4.12.5. Cuantificación de la citoquina pro-inflamatoria (IL-17A) en suero y orina mediante ELISA. ……43
4.12.6. Estudios histopatológicos. ……...44
5. Resultados y discusión. ……...44
5.1. Síntesis química. ……44
5.2. Estudios fisicoquímicos. ……45
5.2.1. Estabilidad y lipofilia. ……45
5.2.2. Liberación de óxido nítrico. ……48
5.3. Citotoxicidad por MTT. ……..49
5.3.1. Citotoxicidad en células derivadas de cáncer de vejiga T24 y 253J. ……49
5.3.2. Citotoxicidad en células derivadas de urotelio SV-HUC-1. …….52
5.4. Índice de selectividad. ……...……...53
5.5. Evaluación del efecto quimiosensibilizador. ……...55
5.6. Estudios de ciclo celular. ……59
5.7. Inducción de la apoptosis celular. ……..……..62
5.8. Determinación del efecto genotóxico. ……66
5.8.1. Inmunocitoquímica γ-H2AX. ……66
5.8.2. Ensayo cometa. ……...68
5.9. Ensayos de migración celular. ……70
5.10. Estudios de la expresión de survivina. ……72

5.11. Determinación del efecto mutagénico. ……74
5.12. Actividad antitumoral *in vivo*. ……75
5.12.1. Desarrollo del modelo de cáncer de vejiga murino y tratamiento intravesical con el compuesto **MV14**. ……75
5.12.2. Estudios de imagen por Resonancia Magnética (MRI). ……...79
5.12.3. Análisis de orina. ……84
5.12.4. Cuantificación de células sanguíneas mediante biometría hemática. ……90
5.12.5. Cuantificación de la citoquina pro-inflamatoria (IL-17A) en suero y orina mediante ELISA. ……94
5.12.6. Estudios histopatológicos. ……...96
6. Discusión general. ……104
7. Conclusión. ……...108
8. Perspectivas. ……108
9. Referencias Bibliográficas. ……...109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparativa de peso molecular y lipofilia del compuesto **MV14** con fármacos de referencia utilizados en la práctica clínica para el tratamiento intravesical del cáncer de vejiga. …….46

Tabla 2. Valores de CI_{50} (μM) del compuesto **MV14** y los fármacos de referencia cisplatino y mitomicina C en las líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga. …….51

Tabla 3. Valores de CI_{50} (μM) del compuesto **MV14** y los fármacos de referencia cisplatino y mitomicina C en la línea celular de vejiga SV-HUC-1. ……53

Tabla 4. Índice de selectividad (IS) determinado por la CI_{50} SV-HUC-1 / CI_{50} línea celular cancerosa. ……55

Tabla 5. Valores del índice de combinación determinado por el método Chou-Talalay a través del programa CalcuSyn. Las líneas celulares T24 y 253J fueron expuestas a dos dosis de **MV14** y concentraciones crecientes del cisplatino durante 24 y 48 horas. …….58

Tabla 6. Número de colonias promedio revertientes para cada una de las cepas en el estudio del compuesto **MV14**. ……75

Tabla 7. Valores normalizados (T/(T+N)) por animal correspondientes al grupo tratado con vehículo y al grupo tratado con **MV14**. …….82

Tabla 8. Resultado del cálculo de la media y el desvío de los valores normalizados (pre y postratamiento) para ambos grupos con cáncer de vejiga. ……83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa global de tasas de incidencia (estandarizadas por edad) para ambos sexos en 2020. Del Observatorio Mundial del Cáncer: herramienta Cancer Today de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. ASR = tasa estandarizada por edad. ……...2

Figura 2. Mapa global de tasa de mortalidad (estandarizada por edad) para ambos sexos en 2020. Del Observatorio Mundial del Cáncer: herramienta Cancer Today de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. ASR = tasa estandarizada por edad. ……...3

Figura 3. Tasas de incidencia estandarizadas por edad, específicas de la región, por sexo para el cáncer de vejiga en 2020. Las tasas se muestran en orden descendente de la tasa mundial estandarizada por edad (W) entre hombres, y las tasas nacionales más altas entre hombres y mujeres están superpuestas. ……4

Figura 4. Tasas de incidencia estandarizadas por edad, específicas de la población uruguaya para el cáncer de vejiga durante el periodo 2016 – 2020. ……...5

Figura 5. Tasas de incidencia de los principales tipos de cáncer a nivel nacional en el periodo 2016 – 2020 y su distribución por departamentos. Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos por 100,000 habitantes. ……..6

Figura 6. Tasas de mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel nacional en el periodo 2016 – 2020 y su distribución por departamentos. Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos por 100,000 habitantes. ……..6

Figura 7. El cáncer de vejiga puede desarrollarse a través de dos vías diferentes, resultando en CVNMI o CVMMI. En el CVNMI, las alteraciones comunes incluyen la deleción del cromosoma 9 y mutaciones en el gen FGFR3, las cuales también se observan en los precursores hiperplásicos. ……...8

Figura 8. (A) La profundidad con la que el tumor infiltra la pared de la vejiga ayuda a clasificar el riesgo entre cáncer de vejiga no músculo-invasivo (CVNMI) y músculo-invasivo (CVMI). Los tumores que no invaden la lámina propia se clasifican como Ta o Tis según el sistema de clasificación de tumores, ganglios y metástasis (TNM). Los tumores que invaden la lámina propia se clasifican en estadio T1 y suelen tener un

comportamiento más agresivo. Los tumores que penetran el músculo detrusor de la vejiga se clasifican como T2, si van más allá se clasifican como T3 y T4, los cuales son altamente agresivos. (B) La clasificación de bajo o alto grado es especialmente relevante en CVNMI, se utilizan dos esquemas de clasificación (OMS 1973 y 2004), además de un sistema híbrido de tres niveles que combina características de ambas clasificaciones. Todos los CVMI se consideran de alto grado. PUNLMP: Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno. ……...10

Figura 9. Estructuras químicas de los quimioterápicos intravesicales utilizados en la clínica para el tratamiento del cáncer de vejiga. ……...13

Figura 10. Reconstrucción urinaria mediante creación de neovejiga. En esta cirugía se extrae la vejiga existente y se forma una bolsa interna con una parte del intestino, llamada neovejiga y sirve para almacenar la orina. ……...15

Figura 11. Respuesta de los tumores a diferentes concentraciones de ·NO, lo que ofrece una oportunidad terapéutica para el cáncer. Los tumores requieren una concentración óptima de ·NO para la proliferación (zona segura). Los niveles intratumorales muy bajos de ·NO inhiben el crecimiento del tumor (zona de inhibición) y los niveles muy altos de ·NO inducen la muerte de las células tumorales (zona de muerte). ……...18

Figura 12. Estructuras de algunos compuestos donadores de ·NO importantes. …….18

Figura 13. Vía del factor nuclear κB (NF-κB). Esta vía actúa sobre genes implicados en el desarrollo y la progresión de la inflamación. El NF-κB es un factor de transcripción inducible. Tras su activación, puede activar la transcripción de varios genes y, por tanto, regular la inflamación. El NF-κB actúa sobre la inflamación no solo directamente, aumentando la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión, sino también regulando la proliferación celular, la apoptosis, la morfogénesis y la diferenciación. …….22

Figura 14. Esquema de la ruta sintética para obtener el compuesto **MV14.** ……44

Figura 15. Imágenes representativas de las cromatografías de TLC para la evaluación de la estabilidad de **MV14** a distintos tiempos y distintos pH. ……..45

Figura 16. Liberación de óxido nítrico de **MV14** cuantificado por la técnica de Griess. …….49

Figura 17. Curvas de porcentaje de viabilidad celular en función de concentraciones crecientes de **MV14**, cisplatino y mitomicina C para las líneas celulares T24 y 253J a 24 h, 48 h y 72 h de incubación. ……50

Figura 18. Curvas de porcentaje de viabilidad celular en función de concentraciones creciente de **MV14**, cisplatino y mitomicina C para la línea celular SV-HUC-1 a 24 h, 48 h y 72 h. ……...52

Figura 19. Porcentaje de viabilidad determinado por el efecto combinado entre el compuesto **MV14** y cisplatino en líneas celulares T24 y 253J a 24 y 48 horas. ……57

Figura 20. Efecto de cisplatino (CDDP), mitomicina C (MMC) y el compuesto **MV14** sobre el ciclo celular en la línea celular de cáncer de vejiga T24. ……60

Figura 21. Efecto de cisplatino (CDDP), mitomicina C (MMC) y el compuesto **MV14** sobre el ciclo celular en la línea celular de cáncer de vejiga 253J. ……61

Figura 22. Gráfico de porcentaje de células en apoptosis (temprana y tardía) y necrosis en la línea celular 253J tratada con camptotecina (CPT) a 5, 10, 20 y 40 µM durante 24 horas. ……...63

Figura 23. Gráficos del porcentaje de apoptosis (temprana y tardía) y necrosis en la línea celular 253J tratada con camptotecina (CPT) 40 µM y **MV14** a (5 y 10 µM) durante 24 horas. ……...65

Figura 24. Intensidad de fluorescencia de γ-H2AX en células T24 y 253J tratadas con **MV14** en ausencia y presencia de hemoglobina (Hb). Control negativo DMSO 0,5% y control positivo SNAP 50 µM. ……67

Figura 25. Ensayo Cometa alcalino de células T24 y 253J tratadas con el compuesto **MV14** a una concentración de 50 µM. Control negativo DMSO 0,5% y control positivo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 100 µM. ……...69

Figura 26. Efecto del compuesto **MV14** sobre la migración celular en las líneas celulares T24 y 253J. a) Porcentaje de área de cierre de herida en presencia de **MV14** a 5 y 10 µM durante un periodo de 17 horas de incubación. Se incluyó SAHA a 10 µM como control positivo. b) Imágenes representativas a las 0 y 17 horas para ambas líneas celulares del

ensayo de herida para cada condición experimental mostrada en a). …….71

Figura 27. Relación survivina/α-tubulina del análisis western blot en las líneas celulares T24 y 253J tratadas con el compuesto **MV14**. …….72

Figura 28. Registro de la ingesta de agua con BBN durante 16 semanas consecutivas. 76

Figura 29. Recolección de orina mediante masaje vesical en ratones hembra C57BL/6. …….76

Figura 30. Instilación intravesical mediante catéter de teflón calibre 24. ……77

Figura 31. Animales bajo anestesia con isoflurano en el tratamiento intravesical. …….78

Figura 32. A) Ratón hembra C57BL/6 anestesiado y colocado en posición prona previo a la entrada al equipo de resonancia magnética. **B)** Equipo de resonancia magnética nanoScan PET/MRI3T(Mediso®). .....……..……...80

Figura 33. Imágenes de MRI comparativas pre y postratamiento del grupo control con BBN y el grupo tratado con el compuesto **MV14**. ……...81

Figura 34. Análisis de sedimento urinario en fresco. Muestra de orina del grupo control sin cáncer de vejiga: **A)** sedimento normal, presencia de escasas bacterias, 1-2 leucocitos por campo (flechas púrpuras), 1-2 eritrocitos por campo (flecha azul). Muestra de orina del grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14** (ratón 3): **B)** sedimento con presencia de abundantes eritrocitos (flecha negra), **C)** sedimento con presencia de abundantes células (flecha púrpura) y presencia de cristales de estruvita (flecha verde). Muestra de orina del grupo con cáncer de vejiga tratado con vehículo (ratón 3): **D)** presencia de cristales de estruvita (flechas amarillas). Campos microscópicos vistos con un objetivo 40X. …….85

Figura 35. Muestra de orina perteneciente al ratón 4 del grupo con cáncer tratado con **MV14** donde se observa la presencia de abundantes células epiteliales (flechas rojas), abundantes eritrocitos (flechas amarillas) y leucocitos (flechas azules). Campo microscópico observado con un objetivo 40X. ……86

Figura 36. Muestra de orina perteneciente al ratón 2 del grupo con cáncer de vejiga tratado con vehículo. **A)** células de tamaño variado, con núcleos grandes y densos (flechas

amarillas), presencia de una célula multinucleada (flecha roja). **B)** grupo de células epiteliales es cohesión, con núcleos grandes y heterogéneos (flecha negra), presencia de leucocitos (flechas rojas). **C)** célula con núcleo agrandado y heterocromático (flecha negra), presencia de leucocitos (flechas rojas). **D)** grupo de células con núcleos grandes y heterogéneos, con nucleolos prominentes (flechas negras), presencia de leucocitos (flechas rojas). **E)** grupo de células en cohesión, con núcleos grandes, pleomórficos y con cromatina densa (flechas rojas). Campos microscópicos observados con objetivo 100X. …….88

Figura 37. Muestras de orina de ambos grupos cáncer de vejiga (ratón 3 y 5 del grupo tratado con vehículo, ratón 2 y 4 del grupo tratado con **MV14**) y muestra de grupo normal (sin cáncer de vejiga). **A)** grupo de células en cohesión con núcleos prominentes, de tamaño irregular, la flecha roja indica una célula multinucleada. **B)** dos células con núcleos agrandados y escaso citoplasma. **C)** dos células con núcleos relativamente grandes y escaso citoplasma (posibles células intermedias o basales). **D)** conglomerado de células con características mixtas, núcleos grandes, hipercromáticos (flecha verde), presencia de leucocitos (flecha amarilla), la flecha roja indica la presencia de abundantes eritrocitos en todo el campo. **E)** célula epitelial normal, con núcleo pequeño y abundante citoplasma. Campos microscópicos observados con objetivo 100X. …….89

Figura 38. Cuantificación de células en sangre periférica de las poblaciones de linfocitos, neutrófilos y monocitos. ……..92

Figura 39. Cuantificación de la concentración de IL-17A. A) Sérica, B) Urinaria. ……..……...95

Figura 40. A) Aspecto macroscópico de las vejigas de los tres grupos de animales. **B)** Gráficos del peso de las vejigas pertenecientes a cada grupo. ……..97

Figura 41. Aspecto macroscópico de los riñones pertenecientes al ratón 1 del grupo normal, y riñones del ratón 1 y 3 del grupo con cáncer de vejiga tratados con **MV14.** …98

Figura 42. Evaluación histopatológica de las vejigas del grupo normal (sin cáncer), grupo con cáncer de vejiga tratado con vehículo y grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14**. Muestras teñidas con hematoxilina-eosina digitalizadas en un aumento 4X. ……...100

Figura 43. Evaluación histopatológica de los riñones del grupo normal (sin cáncer) y los riñones del grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14**. Muestras teñidas con hematoxilina-eosina digitalizadas en un aumento 4X. ……...102

ABREVIATURAS

AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AV	Anexina V
BBN	N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BSA	Albúmina sérica bovina
CEUA	Comisión de Ética en el Uso de Animales
CI_{50}	Concentración inhibitoria media
Cox-2	Ciclooxigenasa-2
CPT	Camptotecina
CVNMI	Cáncer de vejiga no músculo-invasivo
CVMI	Cáncer de vejiga músculo-invasivo
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dFdCDP	Gemcitabina difosfato
dFdCTP	Gemcitabina trifosfato
dNTPs	Trifosfatos de desoxirribonucleótidos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FOV	Campo de visión
Hb	Hemoglobina
IAP	Inhibidores de la apoptosis
IκB	Proteínas inhibidoras de la κB

IC	Índice de combinación
IFN-ɣ	Interferón gamma
IKK	Complejo de quinasa de IκB
IL	Interleucina
IP	Ioduro de propidio
IS	Índice de selectividad
MeOH	Metanol
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NED	*N*-1-naftiletilendiamina dihidrocloruro
NEX	Número de excitaciones
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
PAF	Paraformaldehído
PD-1	Receptor de muerte programada-1
PD-L	Ligando de muerte programada
PEG	Polietilenglicol
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RMI	Resonancia Magnética de Imagen
RNS	Especies reactivas de nitrógeno

SAHA	Vorinostat
SFB	Suero fetal bovino
SNAP	S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
Sp	Resolución espacial en el plano
TC	Tomografía computarizada
TE	Tiempo de eco
TEM	Transición epitelio-mesenquimal
TLC	Cromatografía de capa fina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TR	Tiempo de repetición
TURBT	Resección transuretral del tumor de la vejiga
UTUC	Carcinoma urotelial del tracto urinario
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VOI	Región de interés volumétrica
XlogP3	Lipofilia

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La vejiga urinaria es un órgano hueco y muscular en forma de globo que se encuentra en la pelvis, cuya principal función es almacenar la orina producida por los riñones antes de ser excretada del cuerpo a través de la uretra. La estructura de la vejiga está adaptada para cumplir eficientemente esta función, permitiendo la expansión y contracción conforme se llena y se vacía la orina.

La pared de la vejiga está compuesta por varias capas, cada una con características específicas que contribuyen a su funcionamiento. Del interior hacia el exterior de la vejiga, el orden de capas es:

1. **Mucosa:** capa interna formada por epitelio transicional, también conocido como urotelio, que es único en su capacidad de estirarse y acomodarse a los cambios de volumen de la vejiga. Las células del epitelio transicional tienen propiedades que les permiten crear una barrera impermeable a los componentes tóxicos de la orina, protegiendo así los tejidos subyacentes [1].
2. **Lámina Propia:** situada justo por debajo del epitelio transicional, es una capa de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, nervios y tejido linfático. Esta capa proporciona soporte estructural y nutricional al epitelio transicional y juega un papel importante en la respuesta inmune local.
3. **Músculo Detrusor:** capa gruesa de músculo liso, responsable de las contracciones de la vejiga necesarias para la micción. Está organizado en tres capas: una interna y una externa longitudinales, y una capa media circular. La coordinación de estas capas musculares permite que la vejiga se contraiga de manera eficiente para expulsar la orina [2].
4. **Adventicia/Serosa:** es la capa más externa de la vejiga y está compuesta por tejido conectivo laxo (adventicia) en la mayor parte de su superficie, y por peritoneo (serosa) en la parte superior, donde la vejiga está en contacto con la cavidad abdominal. Esta capa externa protege y ancla la vejiga en su posición dentro de la pelvis.

En términos de inervación, la vejiga está controlada por el sistema nervioso autónomo, incluyendo tanto el sistema simpático como el parasimpático, que regulan respectivamente la retención y la expulsión de la orina. Las interacciones complejas entre

los nervios y el epitelio transicional desempeñan un papel crucial en la función sensorial y motora de la vejiga, afectando la percepción de la plenitud vesical y el control de la micción. Estas características anatómicas y fisiológicas permiten que la vejiga urinaria funcione de manera eficiente, manteniendo un equilibrio entre el almacenamiento seguro de la orina y su eliminación controlada, crucial para el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo [1].

1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE VEJIGA

El cáncer de vejiga es el décimo cáncer más comúnmente diagnosticado en el mundo y plantea un importante desafío de salud pública, con aproximadamente 573.000 casos nuevos y 213.000 muertes anuales. Es más frecuente en hombres que en mujeres, con tasas de incidencia y mortalidad de 9,5 y 3,3 respectivamente por cada 100.000 hombres (Figuras 1 y 2), cifras que son aproximadamente cuatro veces mayores que las de las mujeres a nivel mundial. Por lo tanto, esta enfermedad es más prevalente entre los hombres, siendo el sexto cáncer más común y la novena causa de muerte por cáncer en ellos [3].

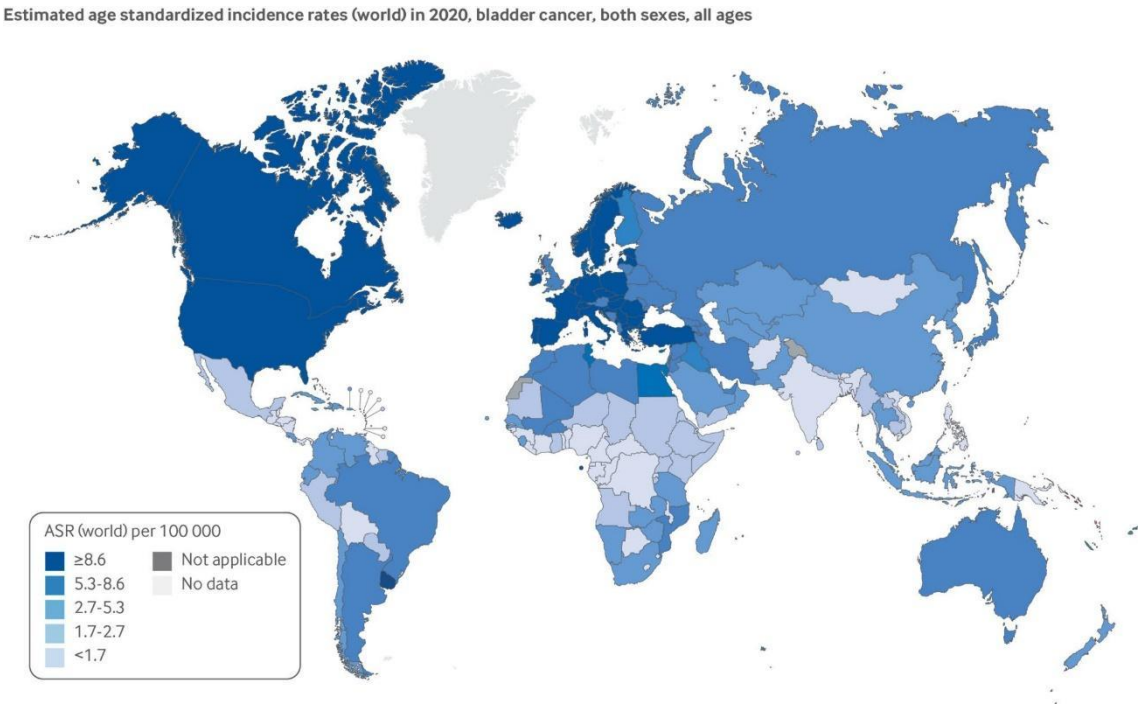

Figura 1. Mapa global de tasas de incidencia (estandarizadas por edad) para ambos sexos en 2020. Del Observatorio Mundial del Cáncer: herramienta Cancer Today de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. ASR = tasa estandarizada por edad [4].

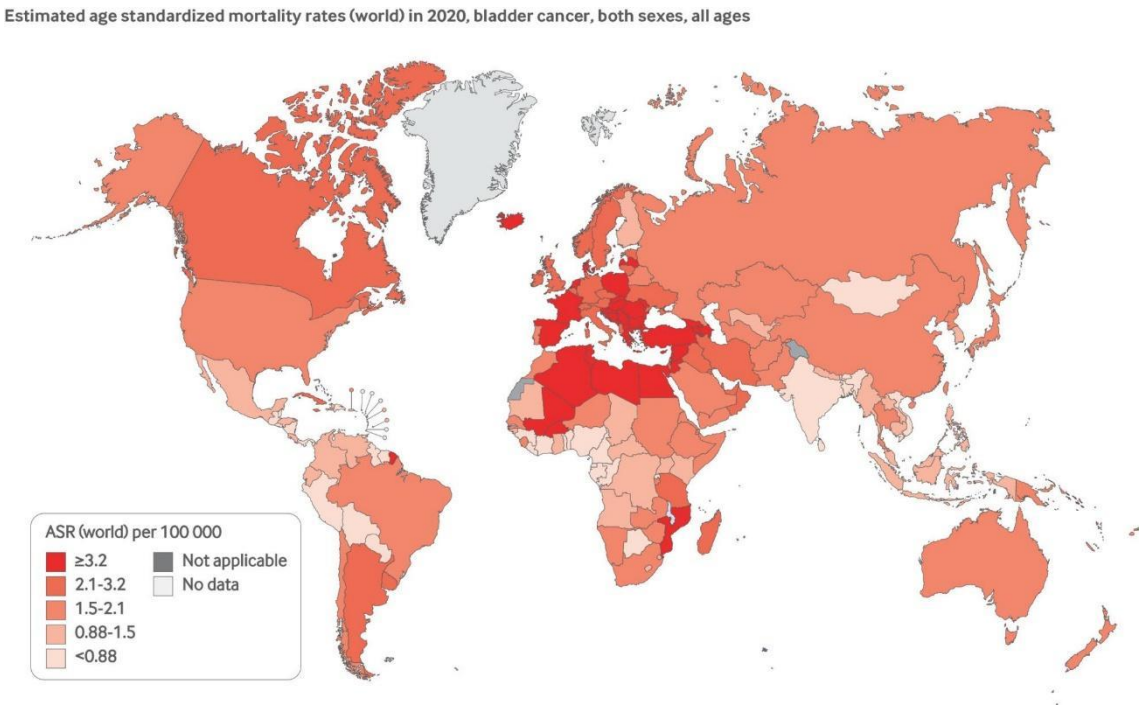

Figura 2. Mapa global de tasa de mortalidad (estandarizada por edad) para ambos sexos en 2020. Del Observatorio Mundial del Cáncer: herramienta Cancer Today de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. ASR = tasa estandarizada por edad [4].

El cáncer de vejiga es una enfermedad compleja con varios factores de riesgo conocidos [5]. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más común, y muchos pacientes con cáncer de vejiga son fumadores activos al momento del diagnóstico. El uso de productos de tabaco sin humo también aumenta el riesgo de desarrollar esta enfermedad. Los factores de riesgo ambientales incluyen la exposición ocupacional a sustancias como caucho, diésel, tintes para pinturas, aceites, solventes de limpieza y carbón, así como el consumo de agua potable contaminada con arsénico o pesticidas. Reducir la exposición a sustancias químicas tóxicas en el lugar de trabajo mediante el uso de equipos de protección adecuados y evitar el consumo de agua potable contaminada puede disminuir el riesgo de cáncer de vejiga. Además, ciertos tratamientos médicos, como protocolos específicos de quimioterapia o radiación (por ejemplo, radiación pélvica, ciclofosfamida), pueden contribuir al desarrollo de cáncer de vejiga iatrogénico. En estos casos, el cáncer de vejiga puede tener un período de latencia de muchos años. Pacientes con irritación crónica del tracto urinario o inflamación debido al uso prolongado de catéteres permanentes también presentan riesgo de desarrollar cáncer de vejiga, ya que estas condiciones suelen asociarse con infecciones frecuentes del tracto urinario [5,6].

A nivel mundial las tasas de incidencia son más altas en el sur de Europa, especialmente en Grecia, seguido de España e Italia, Europa occidental (Bélgica y Países Bajos) y América del Norte. Sin embargo, Hungría presenta las tasas globales más altas entre las mujeres (Figura 3) [3,7].

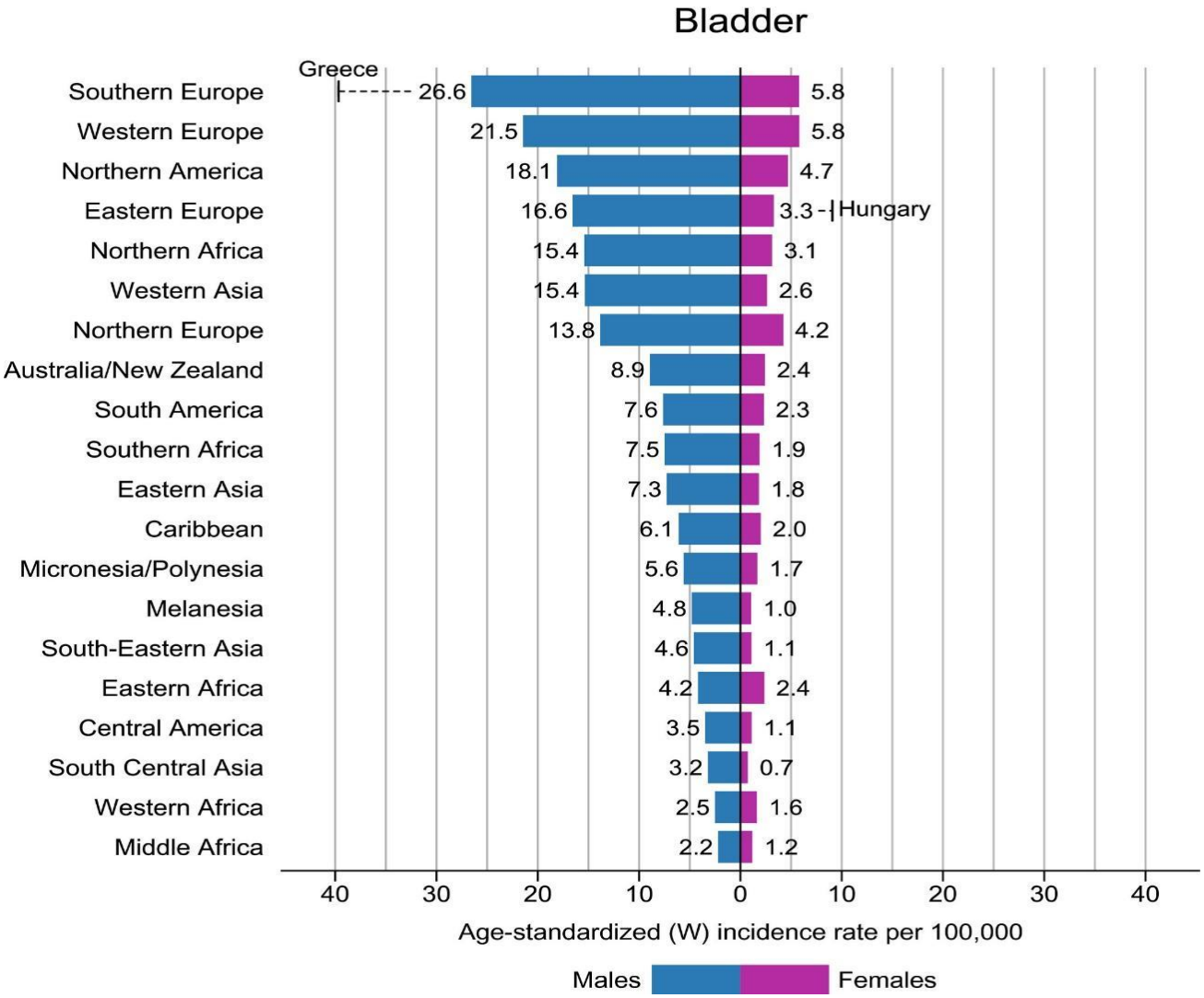

Figura 3. Tasas de incidencia estandarizadas por edad, específicas de la región, por sexo para el cáncer de vejiga en 2020. Las tasas se muestran en orden descendente de la tasa mundial estandarizada por edad (W) entre hombres, y las tasas nacionales más altas entre hombres y mujeres están superpuestas [4].

En Uruguay, el cáncer de vejiga representa una de las neoplasias más relevantes dentro del contexto de la salud pública. Según los datos más recientes del Registro Nacional de Cáncer [8], durante el periodo 2016 – 2020, se registró una incidencia notable de este tipo de cáncer, con tasas ajustadas por edad tanto en hombres como en mujeres. En particular,

la incidencia es significativamente mayor en hombres, lo cual es una tendencia común a nivel mundial, mientras que en mujeres no es de los cánceres más frecuentes (Figura 4).

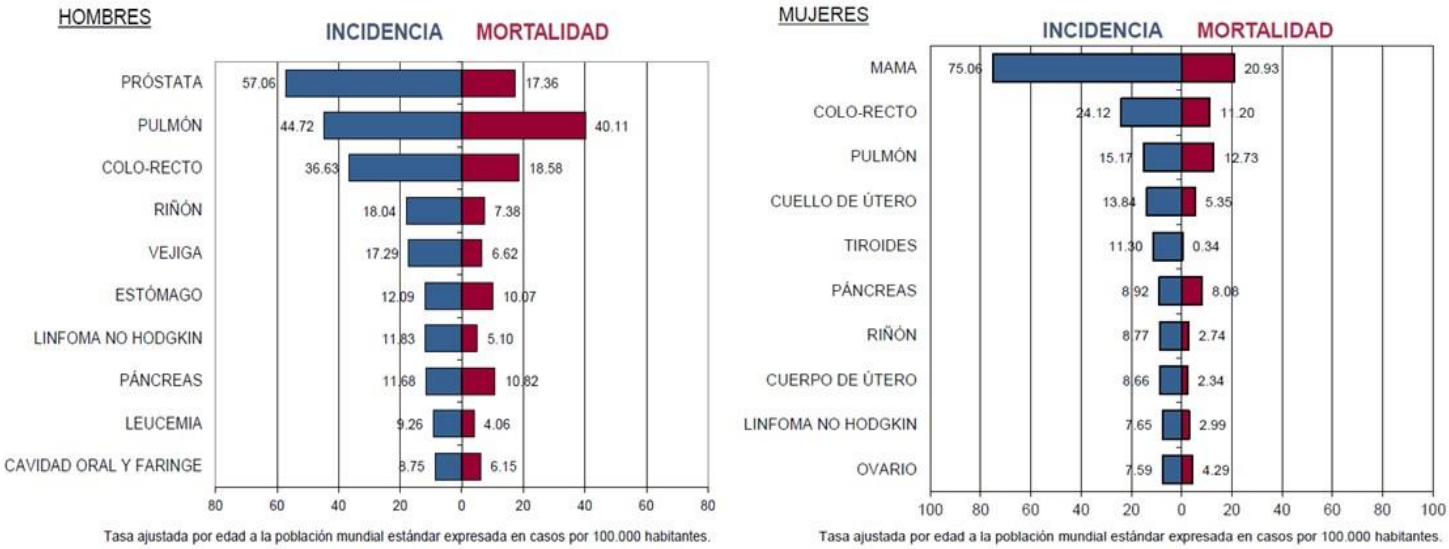

Figura 4. Tasas de incidencia estandarizadas por edad, específicas de la población uruguaya para el cáncer de vejiga durante el periodo 2016 – 2020 [8].

La mortalidad asociada al cáncer de vejiga también presenta cifras considerables. Las estadísticas del informe de 2023 indican que, en comparación con otros tipos de cáncer, la mortalidad por cáncer de vejiga ha mostrado una tendencia relevante estable en los últimos años. Alineado con las tendencias observadas a nivel mundial, el tabaquismo es el principal factor asociado al desarrollo del cáncer de vejiga en Uruguay [8]. La prevención y las campañas de concientización a nivel nacional sobre los efectos del tabaco podrían contribuir a la reducción de la incidencia de esta enfermedad [9].

En términos de distribución geográfica, las tasas de incidencia (Figura 5) y mortalidad (Figura 6) varían entre los diferentes departamentos del país, siendo más altas en áreas con mayor prevalencia de factores de riesgo como el tabaquismo [9]. Además, el envejecimiento de la población uruguaya contribuye al aumento de la incidencia de este tipo de cáncer, ya que la mayoría de los casos se diagnostican en personas mayores de 65 años [8].

CIE-O 3ª Ed.*		TODO EL PAÍS	ARTIGAS	CANELONES	CERRO LARGO	COLONIA	DURAZNO	FLORES	FLORIDA	LAVALLEJA	MALDONADO	MONTEVIDEO	PAYSANDÚ	RÍO NEGRO	RIVERA	ROCHA	SALTO	SAN JOSÉ	SORIANO	TACUAREMBÓ	TREINTA Y TRES
C61	PRÓSTATA	57.06	43.43	42.83	58.61	50.97	48.80	70.19	46.63	35.63	60.84	70.16	38.94	39.00	49.74	75.72	66.59	55.15	53.35	44.81	40.67
C33-C34	PULMÓN	44.72	36.03	40.77	54.27	40.65	48.43	35.79	38.56	49.22	49.56	49.11	32.13	33.81	44.73	53.86	29.98	47.48	41.62	44.67	46.37
C18-C20	COLO-RECTO	36.63	32.42	32.54	39.23	42.55	41.25	31.67	27.98	39.50	36.36	38.25	42.80	31.92	29.92	45.17	39.38	31.02	40.18	37.26	29.51
C64-C65	RIÑÓN	18.04	13.36	14.27	17.24	21.85	20.69	11.72	10.22	11.64	15.62	22.93	14.64	14.96	13.84	19.60	15.69	17.78	13.27	10.57	14.55
C66-C68	VEJIGA	17.29	7.03	16.30	14.75	14.64	12.99	11.10	10.35	15.99	20.60	21.05	18.46	10.46	10.61	14.59	9.71	22.67	15.28	12.89	12.86
C16	ESTÓMAGO	12.09	19.90	10.40	15.60	11.55	13.38	12.65	10.66	11.79	11.99	11.53	15.91	12.24	13.29	11.35	17.78	11.04	12.85	13.63	12.08
	LINFOMA NO HODGKIN	11.83	8.85	9.96	7.18	11.78	9.53	10.59	7.46	13.51	12.06	14.80	10.66	6.27	5.48	10.11	9.59	11.59	10.82	13.58	8.75
C25	PÁNCREAS	11.68	8.40	10.70	9.84	8.92	12.49	12.74	11.78	11.61	13.95	12.74	8.65	12.51	13.62	11.44	11.36	12.20	11.71	9.22	14.05
	LEUCEMIA	9.26	5.93	6.50	8.57	6.86	8.38	7.13	9.47	9.34	7.74	11.72	7.41	7.22	8.39	10.63	9.36	9.22	7.93	11.89	6.63
C0-C14	CAVIDAD ORAL Y FARINGE	8.75	7.95	9.39	8.06	7.57	6.41	6.51	7.87	7.56	7.06	9.68	9.46	5.17	9.90	10.16	10.23	6.10	8.56	6.06	6.01
C00-C80	TODOS LOS CÁNCERES	356.72	285.40	296.80	357.56	359.15	318.07	312.76	251.89	329.37	349.02	420.93	298.69	277.02	318.87	406.37	337.90	350.26	327.31	314.86	300.49
	TODOS LOS CÁNCERES (excluyendo Piel No Melanoma)	299.79	259.99	259.22	313.41	284.72	282.86	258.80	240.10	281.60	296.13	343.44	260.73	232.94	278.97	340.95	288.50	298.26	282.84	273.44	250.62

* Clasificación Internacional de Enfermedades Oncológicas. 3ª Edición. IARC-OMS

Registro Nacional de Cáncer
Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer

Figura 5. Tasas de incidencia de los principales tipos de cáncer a nivel nacional en el periodo 2016 – 2020 y su distribución por departamentos. Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos por 100,000 habitantes [9].

CIE-O 3ª Ed.*		TODO EL PAIS	ARTIGAS	CANELONES	CERRO LARG	COLONIA	DURAZNO	FLORES	FLORIDA	LAVALLEJA	MALDONADO	MONTEVIDEO	PAYSANDU	RIO NEGRO	RIVERA	ROCHA	SALTO	SAN JOSE	SORIANO	TACUAREMBO	TREINTA Y TRES
C33-C34	PULMÓN	40.11	35.07	38.75	48.09	35.65	45.64	39.66	34.45	47.95	44.68	41.30	31.49	36.31	39.66	54.53	29.59	44.93	36.80	39.72	43.19
C18-C20	COLO-RECTO	18.58	18.96	18.65	19.47	20.50	17.87	14.90	17.20	20.61	18.45	18.89	16.57	17.09	14.58	20.67	18.68	16.80	18.63	22.54	14.08
C61	PRÓSTATA	17.36	21.69	15.60	28.17	19.05	18.87	14.93	19.42	19.41	17.59	14.50	16.74	19.14	23.80	24.15	23.63	18.10	20.21	23.53	22.15
C25	PÁNCREAS	10.82	9.93	10.03	9.84	9.85	13.50	13.98	10.49	11.43	12.36	11.27	9.02	13.09	11.50	10.27	9.67	12.13	10.85	9.09	12.96
C16	ESTÓMAGO	10.07	16.38	8.65	12.99	10.26	9.84	8.87	12.70	10.83	9.82	9.69	10.80	11.32	11.08	8.52	14.02	7.96	10.72	12.06	11.18
C64-C65	RIÑÓN	7.38	8.45	8.15	7.53	8.70	11.09	7.65	7.31	5.59	5.39	7.32	7.24	8.16	6.81	5.44	7.69	6.98	7.57	5.09	6.95
C66-C68	VEJIGA	6.62	3.61	7.37	5.97	6.63	6.68	6.20	7.42	10.26	7.08	6.48	6.55	5.04	4.66	8.28	3.69	8.08	5.46	6.99	7.12
C0-C14	CAVIDAD ORAL Y FARINGE	6.15	7.63	6.55	5.53	5.16	6.56	4.93	5.46	9.39	3.38	6.30	5.60	5.65	9.63	7.43	6.97	4.83	6.15	5.51	3.25
C15	ESÓFAGO	5.52	11.19	5.10	10.46	2.67	11.54	6.41	3.92	5.75	6.20	4.29	3.44	3.45	11.83	8.94	7.47	6.36	6.07	5.63	7.44
C70-C72	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	5.18	4.85	4.91	8.14	3.29	1.89	4.89	5.26	7.93	4.64	4.80	4.15	4.84	7.76	7.81	7.51	2.72	8.62	7.60	5.38
C00-C80	TODOS LOS CÁNCERES	168.74	180.22	164.4	203.60	157.99	186.27	147.59	166.02	194.87	166.36	166.88	155.04	161.21	189.15	202.18	165.21	171.49	168.97	174.01	172.85

* Clasificación Internacional de Enfermedades Oncológicas. 3ª Edición. IARC-OMS

Registro Nacional de Cáncer
Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer

Figura 6. Tasas de mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel nacional en el periodo 2016 – 2020 y su distribución por departamentos. Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos por 100,000 habitantes [9].

1.3 DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

El cáncer de vejiga se caracteriza por la proliferación descontrolada de células anormales en la vejiga urinaria, principalmente en el epitelio transicional, siendo más común en hombres que en mujeres. El 70-75% de los pacientes presenta cáncer de vejiga no músculo-invasivo (CVNMI), el 20-25% tienen cáncer de vejiga músculo-invasivo (CVMI) y el 5% sufre de enfermedad metastásica. Aproximadamente el 90% de los casos de cáncer de vejiga son carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas o carcinomas neuroendocrinos [5,10,11,12].

El cáncer de vejiga CVNMI incluye tumores de bajo grado confinados a la mucosa y aquellos que invaden la lámina propia. Estos se clasifican como carcinoma papilar no invasivo, carcinoma *in situ* o carcinoma que invade tejido conectivo subepitelial. Se caracteriza por una alta frecuencia de recurrencia tumoral, una progresión tumoral limitada y una mayor tasa de supervivencia con menor mortalidad específica por cáncer [12].

El cáncer CVMI, por otro lado, incluye tumores de alto grado, localmente avanzados que invaden el tejido muscular o el tejido blando perivesical. También abarca tumores extravesicales que afectan a los órganos adyacentes, la pared pélvica o abdominal, así como tumores metastásicos [12].

El cáncer de vejiga CVNMI suele reaparecer o empeorar, con tasas de recurrencia y progresión a cinco años que van del 31-78% y del 1-45% respectivamente. Dentro de este tipo de cáncer, los carcinomas uroteliales no invasivos de bajo grado tienden a reaparecer con frecuencia, pero rara vez empeoran. En cambio, el carcinoma *in situ* (siempre de alto grado) puede progresar en un 50% de los casos en cinco años. Es importante destacar que, sin tratamiento, el carcinoma *in situ* puede convertirse en cáncer CVMI en un 40-80% de los casos en cinco años.

Para los pacientes con cáncer de vejiga de alto grado, las tasas a cinco años son del 42% para la recurrencia, del 21% para la progresión y del 87% para la supervivencia específica del cáncer. Estas altas tasas de progresión en el CVNMI de alto grado resaltan la necesidad de una terapia intravesical efectiva [5,13].

1.3.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.

El cáncer de vejiga se desarrolla a través de dos vías distintas, lo que da lugar a los subtipos CVNMI y CVMI (Figura 7). Cada uno de estos subtipos tiene características clínicas y patológicas únicas, así como diferencias moleculares específicas. En el caso del CVNMI, las alteraciones comunes incluyen la deleción del cromosoma 9 y mutaciones en el gen FGFR3. Estas alteraciones se observan tanto en los precursores hiperplásicos como en el cáncer de vejiga papilar no músculo invasivo, lo que sugiere una relación clonal entre el precursor y el cáncer de vejiga [5].

Por otro lado, el CVMI se caracteriza por la inactivación de uno o más genes supresores de tumores, como TP53, RB1 y PTEN. El desarrollo de CVMI está precedido por la aparición de displasia urotelial plana y carcinoma *in situ*. Es importante destacar que estas lesiones comparten características moleculares con los carcinomas de vejiga invasivos y de alto grado (Figura 7) [5,14,15,16].

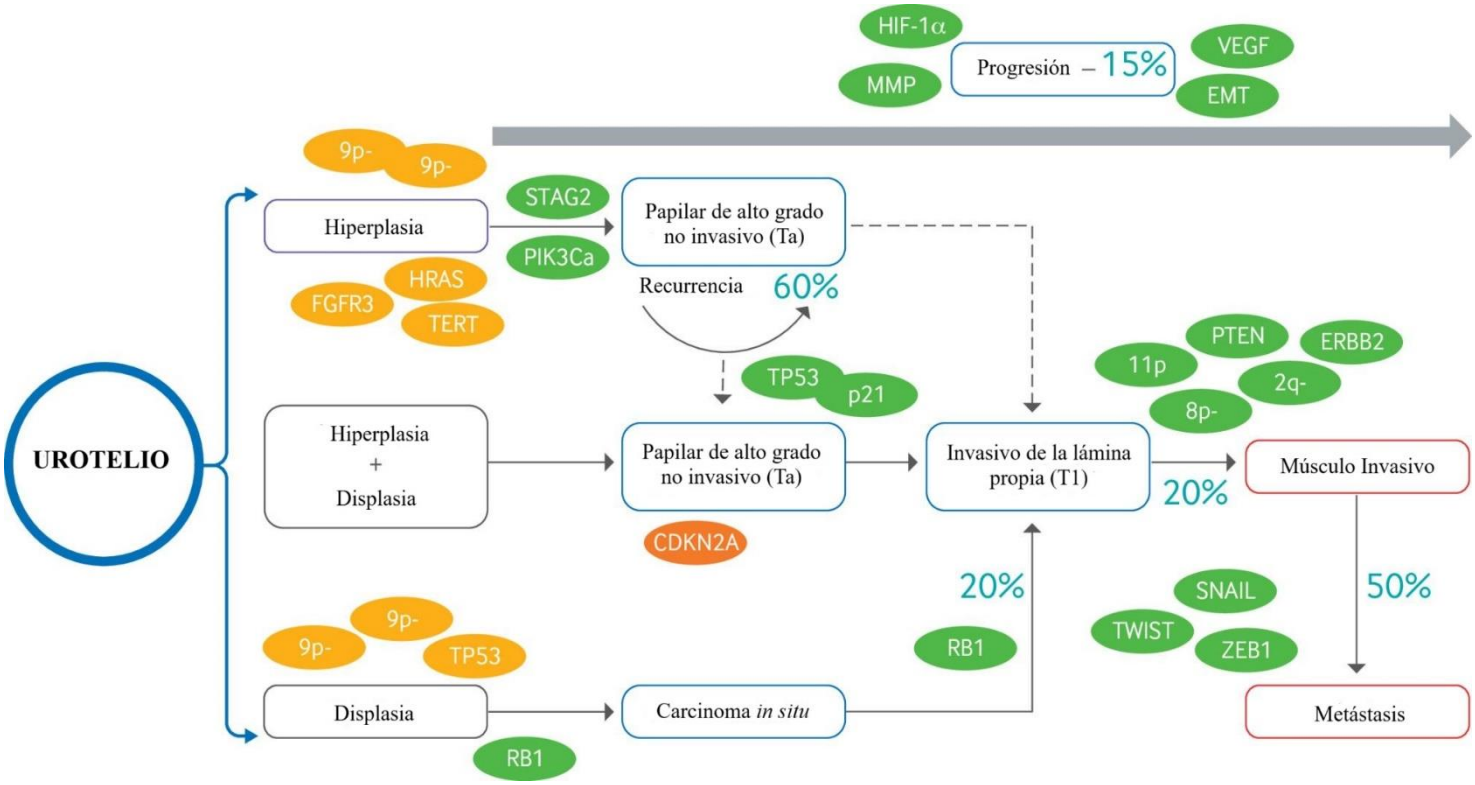

Figura 7. El cáncer de vejiga puede desarrollarse a través de dos vías diferentes, resultando en CVNMI o CVMI. En el CVNMI, las alteraciones comunes incluyen la deleción del cromosoma 9 y mutaciones en el gen FGFR3, las cuales también se observan en los precursores hiperplásicos [5].

1.3.2 PRESENTACIÓN CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

El cáncer de vejiga es una de las patologías más frecuentes del tracto urinario. Aproximadamente el 80% de los pacientes presentan hematuria (sangre en la orina) como síntoma principal. Esta hematuria suele ser intermitente, visible a simple vista (macroscópica) y generalmente indolora, aunque en algunos casos puede ser microscópica y detectable sólo mediante análisis de laboratorio.

En casos de cáncer de vejiga invasivos o carcinoma *in situ*, alrededor del 20% de los pacientes manifiestan síntomas irritativos del tracto urinario como disuria (dolor al orinar), urgencia (necesidad de orinar de inmediato), polaquiuria (aumento de la frecuencia urinaria) e incontinencia. Asimismo, los pacientes pueden experimentar, siendo menos frecuente, síntomas obstructivos del tracto urinario, tales como flujo de orina reducido, intermitente, esfuerzo al orinar o sensación de micción incompleta, especialmente si el tumor se encuentra cerca del cuello de la vejiga o la uretra [17].

En etapas más avanzadas, los pacientes pueden presentar dolor abdominal, edema en las extremidades inferiores debido a la compresión de los vasos ilíacos, o dolor en el flanco causado por la obstrucción de los uréteres. Además, los pacientes pueden experimentar síntomas relacionados con la diseminación metastásica del cáncer comúnmente ubicadas en los ganglios linfáticos, huesos, pulmones, hígado y peritoneo [18,19].

Para el diagnóstico de la enfermedad, en una primera instancia se realiza una evaluación inicial. Se realiza un examen físico, en el cual es raro encontrar hallazgos notables a menos que la enfermedad esté en una etapa avanzada o metastásica, lo que podría revelar una masa palpable en el área renal o vesical. Siguiendo con la evaluación inicial, la cistoscopia es el método principal para evaluar el interior de la vejiga y detectar cualquier anomalía, permitiendo visualizar directamente la vejiga y tomar biopsia de cualquier área sospechosa en caso de ser necesario. Se pueden realizar estudios adicionales como la evaluación de la función renal, para asegurarse que los riñones funcionen correctamente. Además, la realización de imagenología del tracto urinario superior mediante técnicas como la urografía por tomografía computarizada (TC) o la urografía por resonancia magnética (MRI) son de mucha utilidad para detectar posibles tumores en el tracto urinario superior. En pacientes con CVNMI de alto riesgo, especialmente en aquellos con carcinoma *in situ*, se recomienda realizar este tipo de imágenes para detectar posibles carcinomas uroteliales sincrónicos del tracto urinario superior (UTUC). En una segunda

instancia, se realiza la resección transuretral del tumor de la vejiga (TURBT). Este procedimiento es esencial para ratificar el diagnóstico y dar comienzo con el tratamiento inicial del cáncer de vejiga. Durante este procedimiento, se intenta extirpar completamente todo el tejido tumoral visible. La presencia de lámina propia y músculo detrusor en la muestra extirpada es crucial para una estadificación precisa del tumor (Figura 8). La evaluación histológica del tejido obtenido en la TURBT ayuda a determinar la histología, el grado y la profundidad de la invasión del tumor [18,20].

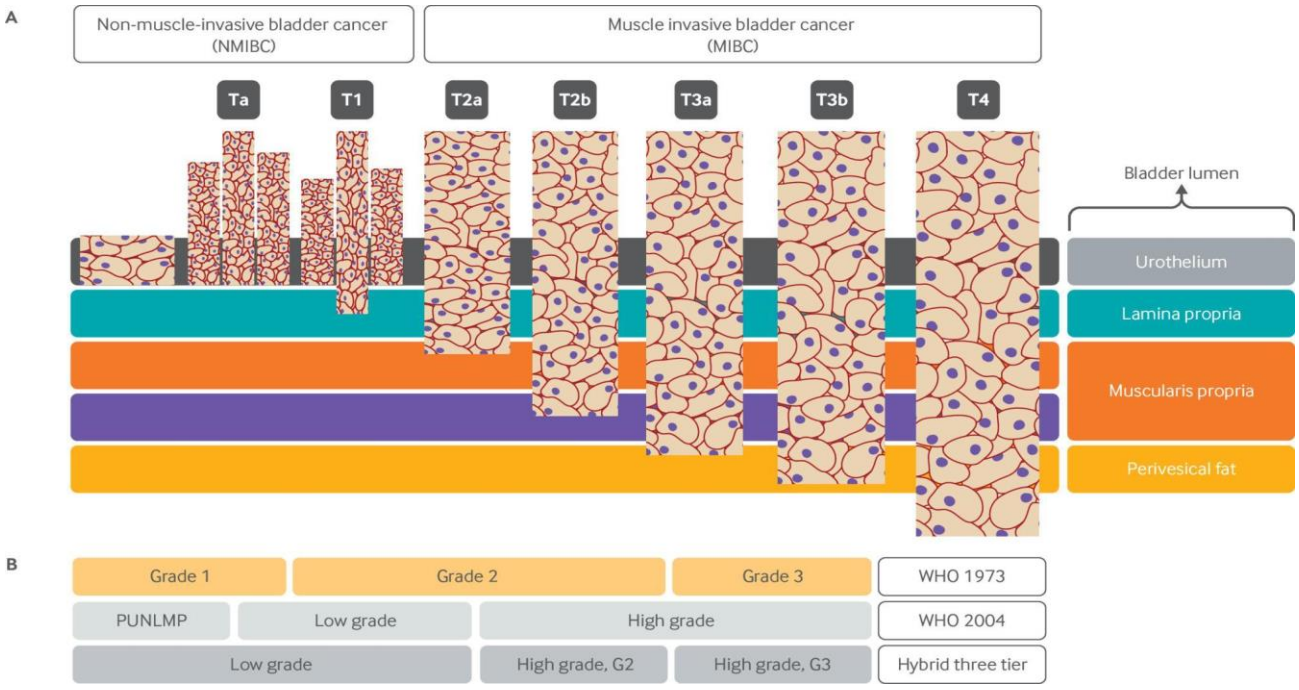

Figura 8. (A) La profundidad con la que el tumor infiltra la pared de la vejiga ayuda a clasificar el riesgo entre cáncer de vejiga no músculo-invasivo (CVNMI) y músculo-invasivo (CVMI). Los tumores que no invaden la lámina propia se clasifican como Ta o Tis según el sistema de clasificación de tumores, ganglios y metástasis (TNM). Los tumores que invaden la lámina propia se clasifican en estadio T1 y suelen tener un comportamiento más agresivo. Los tumores que penetran el músculo detrusor de la vejiga se clasifican como T2, si van más allá se clasifican como T3 y T4, los cuales son altamente agresivos. (B) La clasificación de bajo o alto grado es especialmente relevante en CVNMI, se utilizan dos esquemas de clasificación (OMS 1973 y 2004), además de un sistema híbrido de tres niveles que combina características de ambas clasificaciones. Todos los CVMI se consideran de alto grado. PUNLMP: Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno [5].

1.4 TRATAMIENTOS PARA EL CÁNCER DE VEJIGA

El cáncer de vejiga se clasifica principalmente en dos categorías: CVNMI y CVMI, como ya se describió anteriormente. Cada tipo requiere un enfoque terapéutico específico y adaptado según el estadio de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

1.4.1. TRATAMIENTOS PARA EL CÁNCER DE VEJIGA NO MÚSCULO-INVASIVO (CVMNMI)

Resección Transuretral del Tumor de Vejiga (TURBT)

La TURBT es el tratamiento inicial y estándar para CVNMI. Este procedimiento permite la resección del tumor visible y la obtención de muestras para el diagnóstico histopatológico. Esto es crucial para la evaluación inicial del tumor y, a su vez, se complementa con la realización frecuente de cistoscopias debido a la alta tasa de recurrencia de la enfermedad. La TURBT debe ser exhaustiva para minimizar el riesgo de recurrencia y progresión del cáncer [21, 22].

Quimioterapia Intravesical

La instilación intravesical de fármacos quimioterapéuticos es esencial después de realizar la TURBT, esto con la finalidad de reducir el riesgo de recurrencia. El tratamiento intravesical con el Bacilo Calmette-Guérin (BCG) es el más efectivo para tratar el cáncer CVNMI de alto riesgo ya que reduce significativamente las tasas de recurrencia y progresión del tumor [23]. El BCG es una forma atenuada de *Mycobacterium bovis* y su mecanismo de acción es complejo ya que involucra una combinación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. La activación de la respuesta inmune innata involucra la activación de células inmunes. Una vez instilado en la vejiga, el BCG es fagocitado por las células uroteliales y las células presentadoras de antígeno como los macrófagos y las células dendríticas. Estas células, al reconocer el BCG, se activan y secretan citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la interleucina-1 (IL-1), y la interleucina-6 (IL-6). Estas citoquinas secretadas atraen diversas células inmunes al urotelio, incluyendo neutrófilos, linfocitos T y células natural killer (NK). Este reclutamiento es muy importante para montar una respuesta inmunitaria efectiva contra las células tumorales [5,24].

Para la activación de la respuesta inmune adaptativa, las células presentadoras de antígeno procesan y presentan antígenos del BCG a los linfocitos T. Esta presentación activa los

linfocitos T citotóxicos (CD8+) y a los linfocitos T colaboradores (CD4+), que a su vez se expanden y se diferencian en células efectoras. Los linfocitos T citotóxicos y las células NK reconocen y destruyen las células tumorales. Además, los linfocitos T colaboradores secretan citoquinas como el interferón gamma (IFN-ɤ), que aumenta la capacidad citotóxica de otras células inmunes [24,25].

Las citoquinas liberadas no sólo reclutan y activan células inmunes, sino que también tienen efectos directos sobre las células tumorales, induciendo apoptosis y necrosis. La inflamación inducida por BCG cambia el microambiente tumoral, haciéndolo menos favorable para la supervivencia y proliferación de las células cancerosas. Esto incluye la alteración de factores de crecimiento y la inhibición de la angiogénesis. Además, el tratamiento con BCG no solo proporciona una respuesta inmediata, sino que también induce una memoria inmunológica. Los linfocitos T de memoria pueden responder rápidamente a futuras exposiciones al tumor, proporcionando una protección a largo plazo contra la recurrencia del cáncer de vejiga [5,24,25].

Otros agentes quimioterapéuticos intravesicales como la mitomicina C, gemcitabina y docetaxel (Figura 9), se utilizan principalmente en pacientes que no responden al tratamiento con BCG. La mitomicina C es un antibiótico antineoplásico que actúa mediante varios mecanismos para ejercer su efecto citotóxico sobre las células tumorales. La mitomicina C se activa en el entorno celular y se convierte en una forma alquilante que se une al ADN. Esta unión conduce a la formación de enlaces cruzados intra e inter-hebras. Estos enlaces interfieren con la replicación y transcripción del ADN, formando aductos de ADN, lo que previene la progresión de las horquillas de replicación y causa la detención del ciclo celular, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de ADN y ARN [5,22].

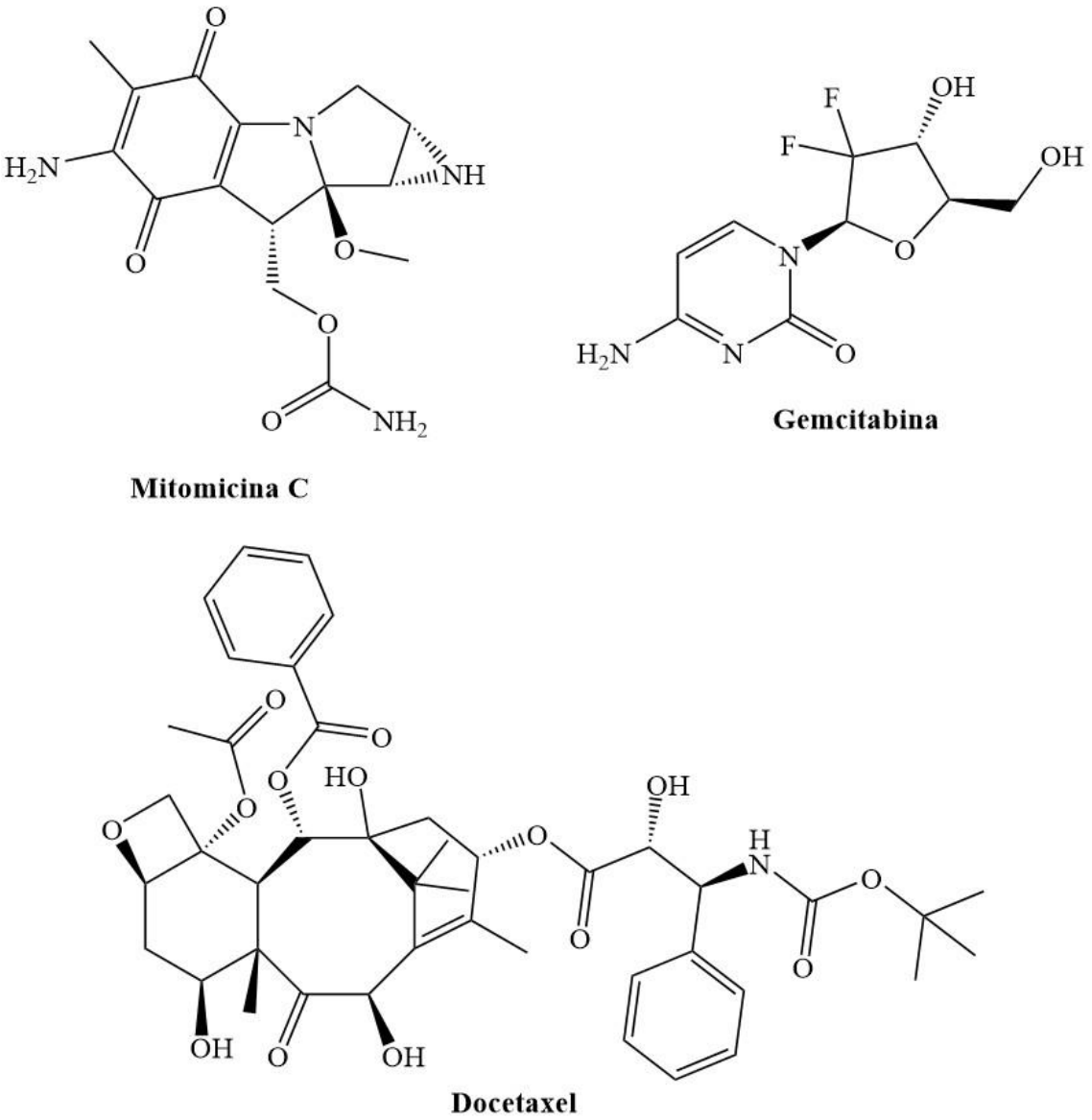

Figura 9. Estructuras químicas de los quimioterápicos intravesicales utilizados en la clínica para el tratamiento del cáncer de vejiga.

Además de formar enlaces cruzados, la mitomicina C puede inducir roturas de la cadena de ADN, lo que contribuye al daño genotóxico. La acumulación de daño en el ADN activa las vías apoptóticas. Las células tumorales con altos niveles de daño en el ADN inducido por mitomicina C activan señales proapoptóticas, como la liberación de citocromo C desde las mitocondrias y la activación de caspasas, llevando a la muerte celular programada. En algunos casos, el daño genotóxico puede inducir un estado de senescencia celular, donde las células dejan de proliferar, pero no mueren inmediatamente. Esta senescencia puede contribuir a la reducción de la progresión tumoral [5,20].

La gemcitabina es un análogo de nucleósido que actúa principalmente mediante la inhibición de la síntesis de ADN. Una vez dentro de la célula, la gemcitabina se convierte en sus formas activas, gemcitabina difosfato (dFdCDP) y gemcitabina trifosfato (dFdCTP) interfiriendo en la replicación del ADN mediante la inhibición de la ribonucleótido reductasa, la inhibición de esta enzima, que es esencial para la conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, reduce la disponibilidad de los precursores necesarios para la síntesis de ADN. También, la gemcitabina trifosfato se incorpora directamente al ADN en lugar de la desoxcitidina trifosfato (dCTP) y una vez incorporada, provoca la terminación prematura de la cadena de ADN e inhibe su reparación, lo que lleva a la apoptosis celular [5,20].

El docetaxel es un agente quimioterapéutico perteneciente a la clase de los taxanos. El docetaxel se une a los microtúbulos y promueve su estabilización, previniendo su despolimerización, esto interfiere con el ensamblaje normal del huso mitótico, bloqueando la progresión del ciclo celular en la fase G2/M. Además, la estabilización excesiva de los microtúbulos desencadena la activación de vías apoptóticas. La interrupción de la dinámica normal de los microtúbulos induce la activación de la proteína p53 y la liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo C, que activan las caspasas y llevan a la apoptosis celular [5,22].

El tratamiento con BCG actualmente sigue siendo el tratamiento intravesical estándar para CVNMI. Su mecanismo de acción implica la inducción de una respuesta inmune local robusta que involucra la activación de macrófagos, linfocitos y células dendríticas. Aunque el tratamiento reduce el riesgo de progresión, requiere vigilancia de por vida, ya que alrededor del 40% de los pacientes fallan al tratamiento y el 70% experimenta efectos adversos [22,24,26]. Debido a esto se necesita avanzar en las investigaciones para mejorar la eficacia de los tratamientos ya existentes, o bien, encontrar nuevas moléculas bioactivas que sean eficaces para el tratamiento de esta enfermedad.

Terapias Emergentes Intravesicales

Existen nuevos agentes intravesicales, como los inhibidores de la tirosina quinasa y la terapia fotodinámica, que están siendo investigados para mejorar los resultados en pacientes con CVNMI. Estos nuevos tratamientos tienen la finalidad de ofrecer alternativas a aquellos pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento con

BCG [25]. La personalización de la terapia basada en el perfil molecular del tumor es una gran estrategia emergente que promete mejorar la eficacia del tratamiento [5].

1.4.2. TRATAMIENTOS PARA EL CÁNCER DE VEJIGA MÚSCULO-INVASIVO (CVMI)

Cistectomía Radical

La cistectomía radical es el tratamiento estándar para el CVMI. Este procedimiento implica la remoción completa de la vejiga y de una linfadenectomía pélvica (extracción de ganglios linfáticos de la pelvis) en el paciente, seguido de la reconstrucción urinaria mediante la creación de una neovejiga a partir de un segmento intestinal (Figura 10). La cistectomía proporciona un control local excelente de la enfermedad y es esencial para los pacientes con CVMI o CVNMI de alto riesgo que no responden a la terapia con BCG [27]. Este procedimiento es la opción más adecuada debido a las tasas de supervivencia superiores en comparación con tratamientos de menor agresividad [21].

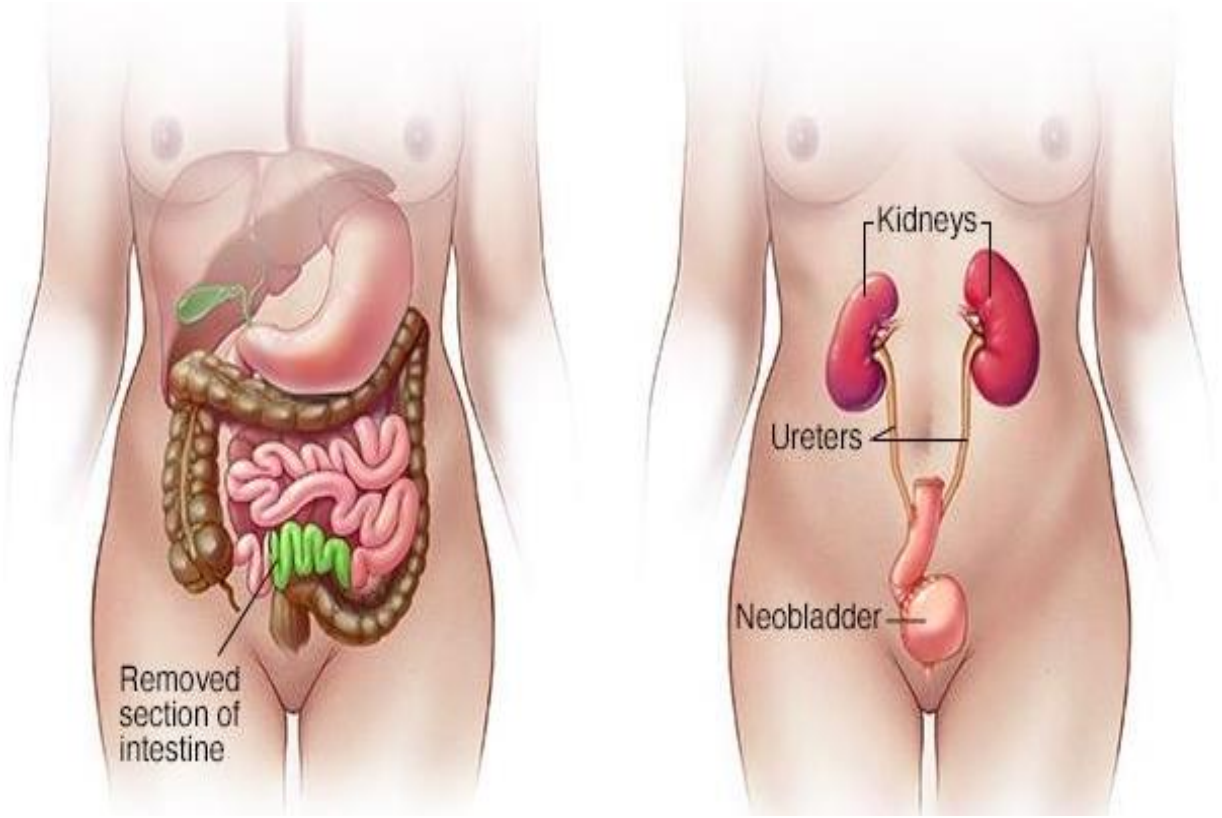

Figura 10. Reconstrucción urinaria mediante creación de neovejiga. En esta cirugía se extrae la vejiga existente y se forma una bolsa interna con una parte del intestino, llamada neovejiga y sirve para almacenar la orina [28].

Quimioterapia Neoadyuvante y Adyuvante

La quimioterapia neoadyuvante (administrada antes de la cistectomía) y la adyuvante (administrada después de la cirugía) son comúnmente realizadas para mejorar los resultados en pacientes con CVMI. Los regímenes basados en cisplatino, como la combinación de cisplatino y gemcitabina, son los estándares debido a su eficacia en la reducción de la masa tumoral y la mejora de la supervivencia global. El cisplatino y la gemcitabina atacan el ADN de manera complementaria. Mientras que el cisplatino forma enlaces cruzados que distorsionan la estructura del ADN, la gemcitabina inhibe la reparación de este daño al incorporarse en la cadena de ADN y detener la replicación. La gemcitabina inhibe la ribonucleótido reductasa, reduciendo los niveles de trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dNTPs) necesarios para la reparación del ADN dañado por el cisplatino. La combinación de estos fármacos resulta en un aumento de la citotoxicidad debido a la acumulación de daño irreparable en el ADN y la activación de múltiples vías proapoptóticas, lo que lleva a una mayor muerte celular en las células cancerosas [5,20,22,29]. La quimioterapia neoadyuvante ha demostrado mejorar significativamente las tasas de supervivencia en comparación con la cirugía sola [21].

Inmunoterapia

Para el cáncer de vejiga avanzado o metastásico, la inmunoterapia ha surgido como un tratamiento crucial. Los inhibidores de *checkpoint* inmunológicos, como pembrolizumab y atezolizumab, han demostrado ser efectivos en mejorar la supervivencia en los pacientes que no responden a la quimioterapia convencional. Estos agentes funcionan bloqueando los puntos de control inmunológicos, permitiéndole al sistema inmunológico atacar las células cancerosas [20,22].

El pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el receptor de muerte programada-1 (PD-1), que es un inhibidor en los linfocitos T. Éste se une al receptor PD-1 en los linfocitos T, bloqueando la interacción entre PD-1 y sus ligandos PD-L1 y PD-L2, que se encuentran sobre la superficie de las células tumorales y otras células inmunosupresoras [5]. Al inhibir esta interacción, pembrolizumab impide la señal inhibidora que normalmente reduce la actividad de los linfocitos T. Como resultado, los linfocitos T pueden reconocer y destruir más eficazmente las células tumorales [20]. La reactivación de los linfocitos T aumenta la producción de citoquinas y la actividad

citotóxica contra las células cancerosas, mejorando así la capacidad del sistema inmunitario para controlar y eliminar el tumor [22].

Por otro lado, el atezolizumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el ligando de muerte programada-1 (PD-L1), que es el ligando del receptor PD-1. Atezolizumab se une a PD-L1, evitando que este ligando interactúe con el receptor PD-1 en los linfocitos T y con la proteína B7.1 en las células presentadoras de antígenos. Este fármaco al bloquear PD-L1 permite la reactivación de los linfocitos T y las células NK, mejorando su capacidad para atacar y destruir las células tumorales. También, al inhibir la señalización inmunosupresora mediada por PD-L1, atezolizumab ayuda a restaurar la función inmunitaria antitumoral, permitiendo una respuesta inmune más efectiva del cáncer [5,20,22].

Los inhibidores de *checkpoint* inmunológicos han demostrado beneficios significativos en la supervivencia de pacientes con cáncer de vejiga avanzado. Su capacidad para reactivar la respuesta inmunitaria permite una mejor vigilancia y eliminación de las células tumorales, superando las estrategias de evasión inmunitaria desarrolladas por el tumor. La inmunoterapia también está siendo investigada como una opción adyuvante para reducir el riesgo de recurrencia después de la cistectomía [27].

1.5 IMPORTANCIA DEL ÓXIDO NÍTRICO Y LA RELEVANCIA DE LOS NUEVOS COMPUESTOS LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE VEJIGA

El óxido nítrico (·NO) es una molécula clave que desempeña un papel fundamental en diversas funciones biológicas y patológicas, incluyendo la regulación de la apoptosis, angiogénesis, la invasión tumoral, la modulación de la respuesta inmunológica y el estrés oxidativo. En el desarrollo del cáncer, los tumores responden de distinta manera al ·NO (Figura 11), en concentraciones bajas, favorece la proliferación tumoral al promover la angiogénesis y la progresión celular, mientras que, a concentraciones más altas, induce apoptosis, sensibiliza las células tumorales a terapias y frena la angiogénesis y la metástasis, es decir que, puede tanto promover como inhibir la progresión de la enfermedad, dependiendo de su concentración y del microambiente tumoral; aunque los niveles de ·NO para ejercer estos efectos pueden variar entre los diferentes tipos de tumores [30].

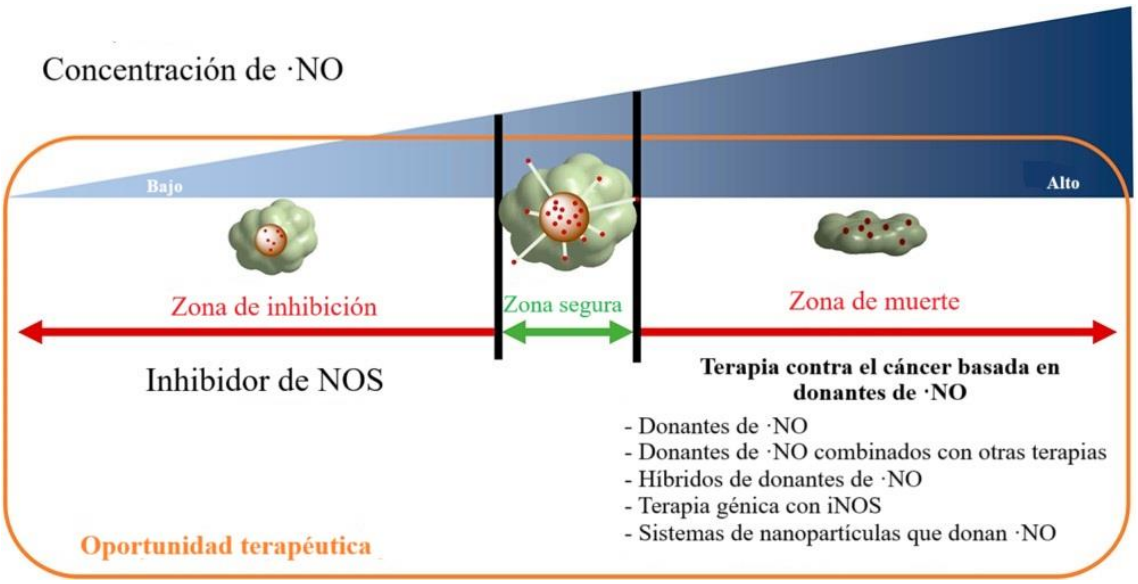

Figura 11. Respuesta de los tumores a diferentes concentraciones de ·NO, lo que ofrece una oportunidad terapéutica para el cáncer. Los tumores requieren una concentración óptima de ·NO para la proliferación (zona segura). Los niveles intratumorales muy bajos de ·NO inhiben el crecimiento del tumor (zona de inhibición) y los niveles muy altos de ·NO inducen la muerte de las células tumorales (zona de muerte) [30].

Los compuestos liberadores de ·NO (Figura 12) presentan un potencial terapéutico muy prometedor en el tratamiento del cáncer. Según Huang y col. (2017), se ha avanzado considerablemente en el uso terapéutico de donadores de ·NO en combinación con quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia, para aumentar la eficacia y especificidad del tratamiento [30].

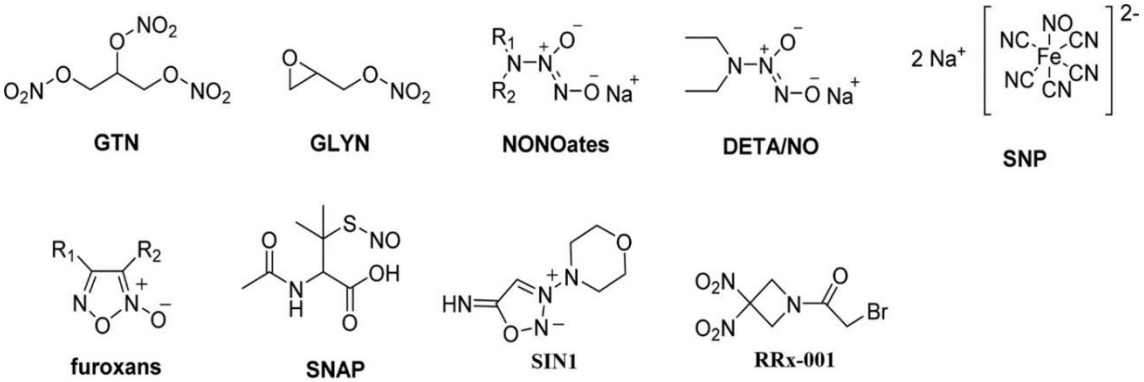

Figura 12. Estructuras de algunos compuestos donadores de ·NO importantes. GTN: trinitrato de glicerilo, GLYN: nitrato de glicidilo, NANOates: Nanoparticulas de ·NO, DETA/NO: diolato de diazenio, SNP: nitroprusiato de sodio, SNAP: S-nitroso-N-acetilpenicilamina, SIN1: 3-morfolinosidnonimina, RRx-001: 1-Bromoacetil-3,3-dinitroazetidina [30].

Estos compuestos liberan ·NO de manera controlada, lo que puede tener efectos antitumorales directos al inducir apoptosis y detener el ciclo celular. El ·NO liberado de estos compuestos ejerce sus efectos mediante distintos mecanismos de acción (Diagrama 1), como lo son la nitrosilación de proteínas y la modulación de vías de señalización. La S-nitrosilación es un proceso en el cual un grupo nitroso se une o enlaza a un residuo de cisteína en una proteína, este puede alterar la función de proteínas clave en la proliferación y la apoptosis celular [31]. El ·NO puede activar o inhibir rutas de señalización celular como la vía del AMPc o la vía de las MAP quinasas [32]. Estudios recientes han demostrado que los compuestos liberadores de ·NO pueden desencadenar apoptosis en células de cáncer de vejiga al aumentar los niveles intracelulares de ·NO, lo que conduce a la activación de las vías apoptóticas [33].

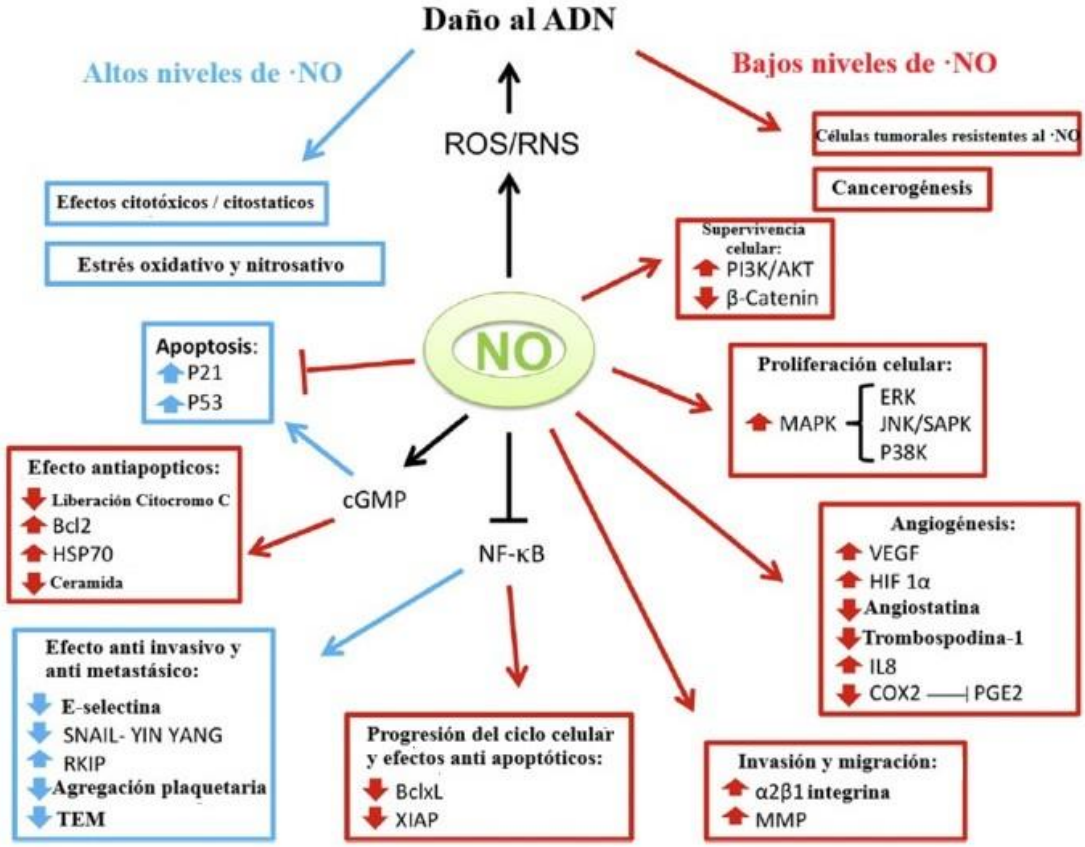

Diagrama 1. Mecanismos de acción del ·NO en la regulación del cáncer. Altos niveles de ·NO (en azul) promueven efectos citotóxicos y citostáticos a través del estrés oxidativo/nitrosativo, causando daño al ADN y activando la apoptosis. Además, inhiben la invasión, la metástasis y la progresión del ciclo celular. Bajos niveles de ·NO (en rojo) favorecen la supervivencia, proliferación celular, angiogénesis, migración e invasión de las células tumorales, contribuyendo a la progresión del cáncer [35].

El ·NO juega un papel complejo en la regulación de la angiogénesis, es decir, en el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. Este proceso implica la migración, el crecimiento y la diferenciación de las células endoteliales que recubren la pared interior de los vasos sanguíneos y está controlado por señales químicas como la activación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Una vez que el VEGF se une a sus receptores en las células endoteliales se inicia la señalización para promover el crecimiento y la supervivencia de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis desempeña un papel fundamental en el crecimiento del cáncer, ya que los tumores necesitan de un suministro de sangre para poder crecer. Estos nuevos vasos sanguíneos proporcionan oxígeno y nutrientes, lo que permite que el tumor se agrande y que las células cancerosas invadan el tejido cercano, se diseminen por todo el cuerpo y formen nuevas colonias de células cancerosas dando lugar a la metástasis [34]. El ·NO en concentraciones bajas a moderadas, puede promover la angiogénesis al activar el VEGF. Sin embargo, en concentraciones elevadas, el ·NO puede inhibir la angiogénesis al inducir daño en las células endoteliales y promover la apoptosis de estas células [35].

También, el ·NO participa en la modulación del sistema inmunológico en el cáncer de vejiga. El ·NO puede aumentar la actividad del sistema inmunológico contra las células tumorales mediante la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa. Para la modulación de la respuesta inmune innata, el ·NO puede aumentar la actividad citotóxica de las células NK, promoviendo así la destrucción de células tumorales. Las células NK son importantes en la respuesta inicial contra el cáncer y su activación por medio del ·NO puede mejorar la capacidad del sistema inmune para controlar el cáncer de vejiga [35]. Asimismo, el ·NO participa en la activación de macrófagos, dando como resultado un aumento en la fagocitosis de células tumorales y la presentación de antígenos a otras células del sistema inmunológico, promoviendo una respuesta antitumoral más efectiva. Además, el ·NO puede regular la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), que desempeña un papel importante en la inflamación local y la respuesta inmune [36].

El ·NO también puede modular la respuesta inmune adaptativa influyendo en la activación y proliferación de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+, que son esenciales para la respuesta inmune contra el cáncer de vejiga [37,38]. El ·NO también desempeña un papel importante en la regulación de la tolerancia inmune y la prevención de respuestas autoinmunes descontroladas. En el cáncer de vejiga, esto puede ser muy importante para

evitar respuestas inmunológicas inapropiadas que podrían interferir con la eficacia del tratamiento [36].

Los compuestos liberadores de ·NO tienen la capacidad de causar un daño significativo en el ADN de las células de cáncer de vejiga, lo que provoca la detención del ciclo celular y la inducción de apoptosis [33]. Además, se ha demostrado que pueden inhibir la vía NF-κB, un factor clave en la inflamación y la progresión, y a su vez reducen la expresión de survivina, una proteína que inhibe la apoptosis, lo cual es esencial para frenar la proliferación de las células cancerosas y favorecer su muerte [33,39].

1.6 VÍA NF-KB

La vía del factor nuclear kappa B (NF-κB) (Figura 13) es un regulador central en diversos procesos biológicos, incluyendo la inflamación, la supervivencia celular y la respuesta inmune [40,41]. Esta vía se activa mediante diversas señales, incluyendo los factores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucinas proinflamatorias (IL-1, IL-17), y juega un papel crucial en la respuesta inmune y la progresión de muchas enfermedades, incluido el cáncer [42,43]. En condiciones normales, NF-κB se encuentra inactivo en el citoplasma unido a proteínas inhibidoras de la κB (IκB), pero cuando es activado, se transloca al núcleo donde regula la expresión de genes implicados en la inflamación, apoptosis y proliferación celular [44].

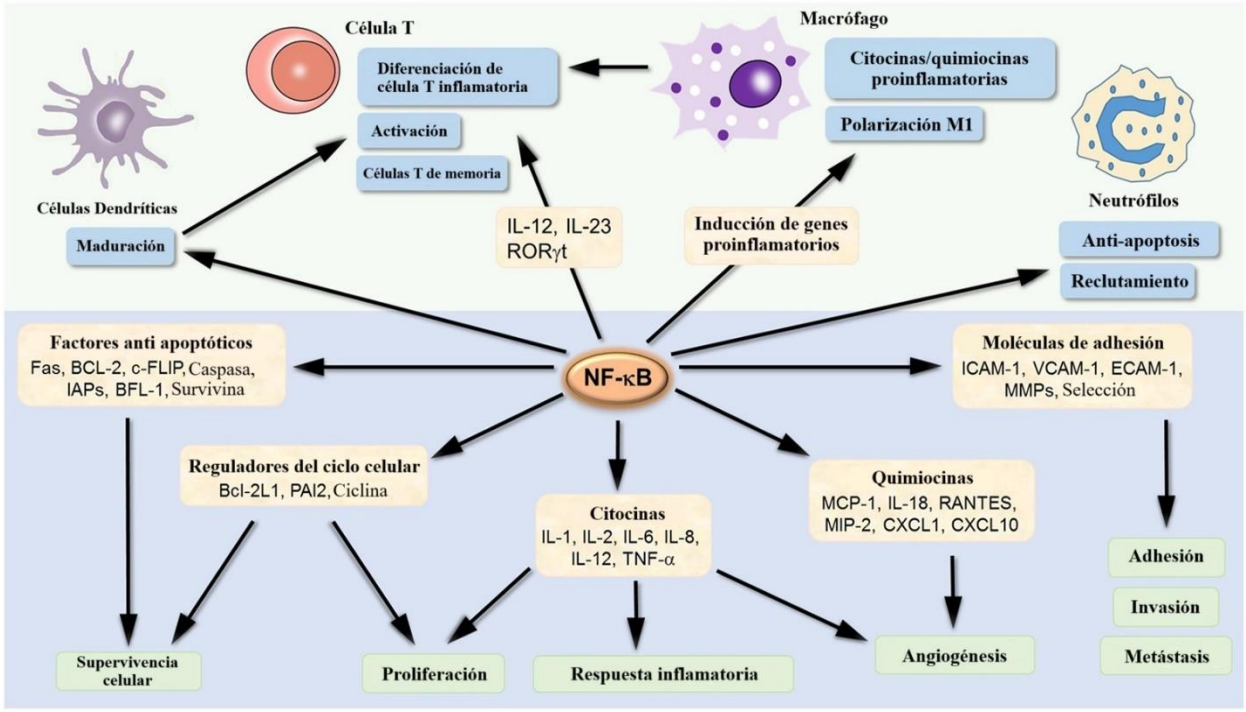

Figura 13. Vía del factor nuclear κB (NF-κB). Esta vía actúa sobre genes implicados en el desarrollo y la progresión de la inflamación. El NF-κB es un factor de transcripción inducible. Tras su activación, puede activar la transcripción de varios genes y, por tanto, regular la inflamación. El NF-κB actúa sobre la inflamación no solo directamente, aumentando la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión, sino también regulando la proliferación celular, la apoptosis, la morfogénesis y la diferenciación. [40].

Cuando la vía NF-κB se activa, los IκB son fosforilados por una quinasa activada por estímulos (IKK, complejo de quinasa de IκB), lo que conduce a la degradación de IκB a través del proteosoma. Esto permite que los dímeros activados de NF-κB (usualmente p50/p65) se transloquen al núcleo, donde activan la transcripción de genes específicos mediante la unión a secuencias de respuesta a NF-κB en el ADN promotor. La vía NF-κB es un regulador crucial en la homeostasis celular y la respuesta a estímulos externos [41,42].

La vía NF-κB es de gran importancia debido a su amplia participación en funciones biológicas y su implicación en diversas enfermedades. NF-κB es un regulador central en la respuesta inflamatoria, la proliferación celular y la inmunidad innata y adaptativa regulando la expresión de numerosas citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y enzimas inflamatorias [44]. Las citoquinas, como la IL-17A, desempeñan un papel crucial en la activación de esta vía. La IL-17A, un mediador proinflamatorio, induce la activación

de NF-κB, promoviendo la producción de otras citoquinas y quimiocinas que amplifican la respuesta inmune y la inflamación [41,45]. Esta activación es crucial en el cáncer, donde NF-κB regula la expresión de genes que facilitan la supervivencia tumoral, la invasión y la resistencia a terapias [42,46]. En el cáncer de vejiga, la activación de NF-κB mediante IL-17A ha sido vinculada con el microambiente tumoral proinflamatorio y la supervivencia celular [47,48].

Además, la vía NF-κB protege a las células del estrés y la apoptosis mediante la inducción de genes antiapoptóticos como Bcl-2, c-IAP y survivina los cuales desempeñan un papel crucial en la supervivencia celular [46,48,49]. También regula genes que promueven la proliferación celular, como c-Myc y ciclooxigenasa-2 (Cox-2) [50]. La vía NF-κB está implicada en el desarrollo de órganos y tejidos, así como en la diferenciación de células inmunes como linfocitos B y T [44]. En condiciones patológicas, la desregulación de esta vía está asociada con la carcinogénesis debido a su papel en la promoción de la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, la inducción de la angiogénesis y la promoción de la invasión y metástasis tumoral [33]. La activación crónica de NF-κB es común en muchos tipos de cáncer y está vinculada a un peor pronóstico [44,50,51].

En el contexto del cáncer de vejiga, la vía NF-κB tiene implicaciones significativas. NF-κB promueve la proliferación de células cancerosas mediante la regulación de genes involucrados en el ciclo celular y la síntesis de ADN [46,47]. Las células del cáncer de vejiga pueden evitar la apoptosis debido a la activación de la vía NF-κB, que induce la expresión de genes antiapoptóticos [46,50]. Asimismo, la activación continua de NF-κB puede crear un microambiente inflamatorio que favorece la progresión tumoral. Esta inflamación crónica contribuye al crecimiento y la invasión del tumor [44,45,48]. La vía NF-κB también regula la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y otras proteínas que facilitan la invasión y metástasis de las células tumorales al degradar la matriz extracelular. Esta vía también promueve la angiogénesis, que es esencial para el suministro de nutrientes y oxígeno al tumor, facilitando así su crecimiento y expansión [48,50].

La inhibición de la vía NF-κB podría ofrecer múltiples beneficios terapéuticos para el tratamiento del cáncer de vejiga. Al inhibir la señalización antiapoptótica mediada por NF-κB, las células cancerosas podrían ser más susceptibles a la apoptosis. También, la inhibición de NF-κB podría disminuir la proliferación celular al reducir la expresión de genes pro-proliferativos, la reducción de inflamación crónica y la secreción de citoquinas

proinflamatorias podría transformar el microambiente tumoral haciéndolo menos favorable para el crecimiento y la invasión del cáncer. Las células cancerosas con menor actividad de esta vía podrían ser más susceptibles a la quimioterapia y la radioterapia, ya que NF-κB también regula los mecanismos de resistencia a estos tratamientos [46,47,48,50].

Los compuestos liberadores de ·NO tienen el potencial de inhibir la vía NF-κB, que juega un papel crítico en la inflamación y la progresión del cáncer. Al inhibir esta vía, se reduce la inflamación y los efectos promotores del cáncer, además ayuda a disminuir las señales de supervivencia dentro de las células cancerosas, haciéndolas más susceptibles a la apoptosis y reduciendo su capacidad proliferativa. Por ello, estos compuestos podrían ser útiles en la terapéutica del cáncer de vejiga [30,33,39]. Además, estos compuestos regulan la fosforilación de IκB o interfieren con la actividad de IKK, dando lugar a la reducción de la translocación de NF-κB al núcleo y, en consecuencia, disminuye la transcripción de genes proinflamatorios y protumorales. La utilización de compuestos liberadores de ·NO en la terapéutica ofrece una estrategia innovadora para transformar el microambiente tumoral, reduciendo las condiciones que favorecen la supervivencia y la proliferación de las células cancerosas. Por lo tanto, los compuestos liberadores de ·NO representan una estrategia prometedora para inhibir NF-κB y mejorar la terapia del cáncer de vejiga [33,47,48,50].

En estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación, se evaluó la capacidad del compuesto **MV14** para inhibir la vía NF-κB. Los resultados obtenidos indican que el compuesto **MV14** inhibe de manera efectiva la activación de esta vía. Esta inhibición es especialmente relevante porque NF-κB regula la expresión de survivina, una proteína antiapoptótica que desempeña un papel fundamental en la resistencia de las células tumorales a los mecanismos de muerte celular programada. La inhibición de NF-κB por **MV14** sugiere que el compuesto podría reducir la expresión de survivina, lo cual es significativo dado el rol de esta proteína en la resistencia tumoral y la proliferación celular. Estos hallazgos resaltan la necesidad de profundizar en el estudio del efecto de **MV14** sobre la regulación en la expresión de survivina, para tener una visión más clara sobre su potencial terapéutico.

1.7 SURVIVINA

La survivina es una proteína perteneciente a la familia de los inhibidores de la apoptosis (IAP). Esta proteína se caracteriza por su capacidad para inhibir la apoptosis y regular el ciclo celular. La expresión de survivina está regulada por la vía NF-κB, normalmente, la survivina se expresa durante el desarrollo fetal y es prácticamente indetectable en tejidos diferenciados de adultos sanos. Sin embargo, su expresión es notablemente elevada en muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de vejiga, donde juega un papel muy importante en la promoción de la supervivencia y proliferación celular [52,53].

El cáncer de vejiga es uno de los tipos de cáncer más asociados con la sobreexpresión de survivina. Numerosos estudios han demostrado que niveles elevados de survivina en los pacientes con cáncer de vejiga se correlacionan con un peor pronóstico y una mayor resistencia a la quimioterapia [52,53,54]. La alta expresión de survivina en las células tumorales de la vejiga también se ha utilizado como un biomarcador para la detección temprana de este tipo de cáncer. Técnicas como la PCR en tiempo real han validado la utilidad de la survivina como un marcador no invasivo en la orina para la detección del cáncer de vejiga [55].

La sobreexpresión de survivina en el cáncer de vejiga está asociada con varios factores desfavorables:

1. **Agresividad tumoral**: la alta expresión de survivina está vinculada a un comportamiento tumoral más agresivo. Esto se debe a que la survivina permite que las células cancerosas eviten la apoptosis y continúen dividiéndose, lo que resulta en un crecimiento tumoral más rápido y agresivo [52,56]
2. **Resistencia al tratamiento**: las células cancerosas con alta expresión de survivina tienden a ser más resistentes a los tratamientos convencionales como la quimioterapia y la radioterapia. La capacidad de la survivina para inhibir la apoptosis permite que las células cancerosas sobrevivan a los tratamientos diseñados para matarlas [54,57].
3. **Peor supervivencia global**: los pacientes con cáncer de vejiga que presentan altos niveles de survivina generalmente tienen una supervivencia global más baja. La presencia de survivna se ha utilizado como un factor pronóstico negativo en varios estudios clínicos [53,56].

La activación de la vía NF-κB y la sobreexpresión de survivina permiten que las células tumorales eviten la apoptosis, favoreciendo la proliferación y la resistencia a los tratamientos [41,52]. Diversos estudios han demostrado que la activación de NF-κB y la sobreexpresión de esta proteína está asociada con un peor pronóstico y una mayor agresividad tumoral [33,52,54,58]. Investigaciones recientes sugieren que la inhibición de NF-κB puede reducir significativamente la expresión de survivina, lo que haría a las células tumorales más susceptibles a la apoptosis y mejoraría la eficacia de las terapias [33,53,58]. Por lo tanto, survivina emerge como un importante biomarcador y objetivo terapéutico en el cáncer de vejiga, vinculado estrechamente a la activación de la vía NF-κB [33,54,57,58].

La survivina desempeña dos funciones principales, la inhibición de la apoptosis y la regulación del ciclo celular. La survivina inhibe la apoptosis al interferir con la actividad de las caspasas, especialmente la caspasa-3 y caspasa-7, que son enzimas esenciales en la vía de la apoptosis. Al unirse a estas caspasas, la survivina previene la activación de los mecanismos de muerte celular programada, lo cual es vital para la supervivencia de las células cancerosas [52]. Durante la mitosis, la survivina forma parte del complejo del centrómero, que es fundamental para la correcta segregación de los cromosomas. La proteína participa en la formación y estabilidad del huso mitótico, asegurando que las células se dividan correctamente. Esto es particularmente importante en las células cancerosas, que se dividen de manera rápida y descontrolada [53].

Además de su conocida función como inhibidora de la apoptosis, la survivina desempeña un papel fundamental en la migración celular de células cancerosas al influir en la dinámica y estabilidad de los microtúbulos, elementos fundamentales para la movilidad celular. Esa proteína interactúa directamente con la tubulina, un componente esencial del citoesqueleto, promoviendo su estabilización y facilitando la formación de invadopodios, estructuras que permiten a las células tumorales invadir los tejidos circundantes [59,60]. La survivina no solo bloquea los mecanismos apoptóticos, sino que también favorece la reestructuración del citoesqueleto, lo cual es indispensable para los procesos de migración y metástasis [58,59]. Su sobreexpresión incrementa la capacidad de las células tumorales para mantener su movilidad, contribuyendo de manera significativa a la agresividad y propagación del cáncer [52,61].

La survivina es considerada un blanco *undrugable* debido a la varias características estructurales y funcionales que impiden su inhibición directa por fármacos tradicionales. Sin embargo, los compuestos liberadores de ·NO ofrecen un enfoque innovador al atacar indirectamente su expresión mediante la inhibición de la vía NF-κB, la cual es responsable de regular la expresión de survivina [33]. Estudios recientes han demostrado que la inhibición de la vía NF-κB mediante compuestos liberadores de ·NO es efectiva en reducir la progresión tumoral y mejorar la respuesta a tratamientos en cáncer de vejiga, lo que subraya el potencial terapéutico de estos compuestos en la lucha contra blancos como la survivina [33,52,54]. La survivina también está estrechamente relacionada con los mecanismos de respuesta al daño y reparación del ADN, favoreciendo la supervivencia celular en condiciones de estrés genotóxico [33,52].

Los compuestos liberadores de ·NO presentan una estrategia prometedora al inducir daño directo en el ADN de las células tumorales generando especies reactivas de nitrógeno (RNS), generando estrés nitrosativo y oxidativo que induce efectos citotóxicos en las células cancerosas. Bajo el estado oxidativo, el ·NO genera anhídrido nitroso y peroxinitrito, siendo los principales inductores de genotoxicidad, promoviendo la desaminación de bases del ADN, la oxidación de bases y de la desoxirribosa, así como la formación de roturas en las cadenas del ADN [33]. Estas alteraciones si no son reparadas adecuadamente, desencadenan muerte celular. Sin embargo, en las células cancerosas, la sobreexpresión de survivina y la activación de la vía NF-κB permiten que las células reparen este daño, aumentando su capacidad de supervivencia [33,59,61]. La inhibición de la vía NF-κB por compuestos liberadores de ·NO es crucial en este contexto, ya que esta regula la expresión de múltiples genes involucrados en la reparación del ADN, entre ellos la survivina [41]. Al bloquear esta vía, se disminuye la producción de esta proteína, lo que a su vez compromete la capacidad de las células tumorales para llevar a cabo una reparación eficiente del ADN. Cuando se inhibe la expresión de survivina, las células pierden un mecanismo vital de defensa contra el daño inducido al ADN, lo que aumenta la probabilidad de que las células cancerosas no puedan reparar el daño genético y, como consecuencia, entren en apoptosis [41,52,59].

Además, el ·NO liberado de estos compuestos no solo genera daño al ADN, lo que activa mecanismos de apoptosis, sino que también inhibe directamente la función de survivina a través de la nitrosilación de aminoácidos críticos en su estructura [61]. Esta doble función del ·NO, por un lado, induce apoptosis en las células cancerosas y, por otro,

disminuye la resistencia a la apoptosis al inhibir la expresión de survivina, promoviendo así la reducción tanto de la proliferación como de la migración celular [52,59,60,61]. La nitrosilación de residuos específicos de survivina afecta su estabilidad, función y capacidad de unirse a otros factores celulares clave, como las proteínas del citoesqueleto y los complejos de reparación de ADN. Así, se debilita tanto la actividad antiapoptótica de la célula como su capacidad de movilizarse e invadir nuevos tejidos, inhibiendo procesos críticos como la migración y la metástasis de las células tumorales [30,60,61]. De esta forma los compuestos liberadores de ·NO presentan un doble mecanismo de acción, primero, inducen daño directo al ADN a través de RNS, lo que compromete la viabilidad de las células tumorales, y segundo, inhiben la actividad de la survivina bloqueando la capacidad de reparación del ADN de las células tumorales [41,54].

En resumen, la survivina es una proteína clave en la regulación de la apoptosis y la proliferación celular, y su sobreexpresión está fuertemente asociada con el cáncer de vejiga. Su alta expresión en células tumorales está correlacionada con un mal pronóstico y resistencia al tratamiento. La modulación de la expresión de survivina mediante compuestos liberadores de ·NO representa una prometedora estrategia terapéutica, proporcionando una vía para inducir apoptosis en células cancerosas, inhibir la migración y mejorar la eficacia del tratamiento de esta patología.

2. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis de trabajo establece que el compuesto liberador de óxido nítrico **MV14** inhibe la proliferación e induce la apoptosis de células de cáncer de vejiga a través de la modulación de la vía NF-κB y la expresión de la proteína survivina a la vez de que sensibiliza las células cancerígenas a la quimioterapia clásica. Por lo tanto, el compuesto **MV14** es un potencial agente quimioterapéutico capaz de atacar los mecanismos subyacentes a la progresión y resistencia del cáncer vesical.

3. OBJETIVOS

3.1.1. OBJETIVO GENERAL

Investigar el mecanismo de acción de **MV14** en cultivos celulares derivados de cáncer de vejiga y evaluar su efecto antitumoral en un modelo *in vivo* para determinar su potencial aplicación como quimioterápico intravesical para el cáncer de vejiga no músculo invasivo.

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar la síntesis química del compuesto **MV14** teniendo como base los principios de la química verde.
2. Realizar estudios fisicoquímicos para caracterizar las propiedades del compuesto.
3. Determinar la citotoxicidad y el efecto sensibilizador de **MV14** a un quimioterápico de uso clínico.
4. Estudiar el ciclo celular y la apoptosis en cultivos de células derivadas de cáncer de vejiga
5. Evaluar el efecto genotóxico del compuesto determinando su capacidad para inducir daño en el ADN.
6. Analizar la migración celular y la expresión de survivina.
7. Determinar el efecto mutagénico de **MV14** mediante test de AMES. Generar un modelo *in vivo* de cáncer de vejiga y evaluar la actividad antitumoral de **MV14.**

4. METODOLOGÍA

4.1. Síntesis química

Los disolventes se purificaron y secaron, previo a su utilización, por métodos convencionales. Otros reactivos fueron adquiridos en empresas comerciales y usados sin mayor purificación. Los espectros ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN de los compuestos se realizan en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz y 100 MHz). Como disolvente se utilizó $CDCl_3$ y TMS como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de δ (ppm). El avance de las reacciones, así como la pureza de los productos, se controló mediante cromatografía en capa fina de sílica gel (Alugram Sil G/UV254) o de óxido de aluminio. Para las cromatografías en columna, se utilizó sílica gel (Kieselgel, tamaño 0.063-0.2 mm, J. T. Baker).

2-Hidroxietilcarbamato de *tert*-butilo (2): A una solución de etanolamina (2,5 mmol) en agua (2,5 mL) se añadió Boc_2O (0,60 g, 2,75 mmol, 1,1 equiv) a temperatura ambiente. La reacción se mantuvo agitando durante 20 minutos. La mezcla de reacción se trató con acetato de etilo y se separaron las fases. La capa orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl, luego se secó con Na_2SO4, filtró y evaporó el disolvente a presión reducida para dar el compuesto **2** con rendimiento cuantitativo. Los datos espectroscópicos de RMN están de acuerdo con la literatura [62].

^{1}H-RMN: δ ($CDCl_3$) = 4.97 (sa, 1H), 3.72 (dd, *J* = 10.1, 5.1 Hz, 2H), 3.30 (dd, *J* = 10.1, 5.1 Hz, 2H), 2.41 (sa, 1H), 1.46 (s, 9H).

***N*^{2}-óxido de 3,4-bis(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol (3)**: Se sintetiza de acuerdo con el método descrito en la bibliografía [63].

***N*^{2}-óxido de 4-(2-((tert-butoxicarbonil)amino)etoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol (MV14):** A una solución de **2** (44 mg, 0,273 mmol) y furoxano **3** (100 mg, 0,273 mmol) en metilTHF (2 mL) en un baño de hielo, se agrega lentamente NaOH ac. (0,66 mmol) y se deja agitando 24 horas a temperatura ambiente. Se agrega acetato de etilo y se realizan lavados con HCl 10%, y solución saturada de NaCl luego se seca con Na_2SO_4, filtra y evapora el disolvente a presión reducida. El producto crudo se purifica por cromatografía en columna (SiO_2, gradiente $CHCl_3$:MeOH). Sólido blanco. R: 22 %.

^{1}H-RMN: δ ($CDCl_3$) = 8.12 – 8.06 (m, 2H), 7.79 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.66 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.99 (s, 1H), 4.50 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.64 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H).

^{13}C-RMN: δ ($CDCl_3$) = 158.8, 155.7, 137.9, 135.7, 129.7, 128.6, 110.5, 80.1, 70.7, 39.4, 28.4.

4.2. Estudios fisicoquímicos

4.2.1. Estudios de estabilidad y lipofilia

Con el fin de conocer acerca del comportamiento de **MV14** en el ambiente intravesical, se evaluó la estabilidad de **MV14** en agua y en buffer en un rango de pH de 4-8 a temperatura ambiente y a 37ºC durante 1, 2 y 24 horas. La estabilidad del compuesto fue visualizada mediante cromatografía de capa fina (TLC) utilizando diclorometano/metanol (98:2) como fase móvil. Las cromatografías fueron observadas utilizando una lámpara de luz negra UV (UV-A) (Spectroline ENF-260C/FE). La lipofilia fue determinada mediante modelo *in silico* utilizando la herramienta web SwissADME [64], se incluyeron mitomicina c y gemcitabina, fármacos de referencia utilizados en el tratamiento intravesical.

4.2.2. Liberación de óxido nítrico

Se determinó la liberación de óxido nítrico del compuesto **MV14** en medio fisiológico mediante la técnica de Griess [65]. Esta técnica se basa en la formación de un cromóforo por medio de la reacción de sulfanilamida con nitrito (NO_2^-) en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como la *N*-1-naftiletilendiamina dihidrocloruro.

El compuesto fue solubilizado en DMSO y luego diluido a una concentración de 100 μM en una solución PBS (Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 2mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM)/Metanol 50/50 v/v. Posteriormente, se incubó en presencia de L-cisteína a una concentración de 500 μM (un exceso de 5 veces en relación con el compuesto **MV14**) durante 1, 3, y 6 horas a 37ºC [66]. El liberador de óxido nítrico comercial SNAP (S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina) (Sigma, N3398-25MG) (100 μM) fue incluido como control positivo. En una placa de 96 pocillos se adicionaron 50 μL de la solución PBS/Metanol con el compuesto **MV14** y a su vez se agregaron 50 μL de solución de Sulfanilamida (1% de sulfanilamida en 5% de ácido fosfórico) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos protegido de la luz. Posteriormente, se agregaron 50 μL de solución NED (0,1% de *N*-1-naftiletilendiamina dihidrocloruro en agua) (CHEM-IMPEX

INT´L INC, Cat. No. 00222) y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Al mismo tiempo, se realizó una curva estándar con $NaNO_2$ a diluciones seriadas en un rango de concentraciones de 0 a 100 μM en 50 μL de solución PBS/MeOH. Finalmente se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro de microplaca (Varioskan Flash, Thermo Fisher). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante two-way ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

4.3 Citotoxicidad por MTT

4.3.1. Citotoxicidad en células derivadas de cáncer de vejiga T24 y 253J

La citotoxicidad inducida por **MV14** fue determinada en las líneas celulares T24 (línea celular derivada de carcinoma transicional grado 3) [67] y 253J (derivada de un cáncer metastásico de vejiga grado 4, con posible resistencia al quimioterápico cisplatino) [68,69] mediante el ensayo colorimétrico de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma, M2128-500MG) [70]. El MTT es reducido por la acción de reductasas celulares al producto formazán por aquellas células metabólicamente activas y por lo tanto viables.

Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos en medio McCoy's 5A (Capricorn, MCC-A) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Capricorn, SFB-11A) a una densidad de 8×10^3 células por pocillo en 100 μL de medio de cultivo y se incubaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Luego, las células fueron tratadas con **MV14** en un rango de concentraciones de 0,09 a 12,5 μM, cisplatino (Merck, 232120-50MG) de 3,13 a 200 μM y mitomicina C (Sigma, M4287-2MG) de 6,25 a 200 μM y se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 24, 48 y 72 horas. Cada condición fue evaluada por sextuplicado en al menos 3 ensayos independientes. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 μL de solución de MTT (0,25 mg/mL) en medio de cultivo y las células se incubaron durante 4 horas. Los cristales de formazán se solubilizaron mediante el agregado de 100 μL de DMSO:isopropanol 1:1. Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplaca (Varioskan Flash, Thermo Fisher). La concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) se determinó mediante análisis de regresión no lineal utilizando GraphPad Prism versión 8.0.1.

4.3.2. Citotoxicidad en células derivadas de urotelio SV-HUC-1

Posteriormente, se determinó la citotoxicidad del compuesto en la línea celular uroepitelial humana inmortalizada SV-HUC-1. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medio F12-K (Gibco, 21127022-F12) suplementado con 10% de SFB a una densidad de 2,5 x 10^4 células por pocillo en 100 µL de medio de cultivo, se incubaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Luego, las células fueron tratadas con **MV14** en un rango de concentraciones de 0,39 a 12,5 µM, cisplatino de 3,13 a 100 µM y mitomicina C de 6,25 a 200 µM y se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 24, 48 y 72 horas. Cada condición fue evaluada por cuadruplicado en al menos 4 ensayos independientes. Posteriormente, se procedió con el ensayo de MTT como se detalló anteriormente. Las CI_{50} se determinaron mediante análisis de regresión lineal.

4.4 Índice de Selectividad

El índice de selectividad (IS) es una medida utilizada en estudios de cáncer y el desarrollo de fármacos para evaluar la especificidad y eficacia de un agente terapéutico en matar células cancerosas en comparación con células normales. Este índice se calcula como la relación entre las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) del compuesto en estudio en células normales y células cancerosas utilizando la siguiente fórmula:

$$IS: \frac{CI_{50}\ línea\ celular\ normal}{CI_{50}\ línea\ celular\ cancerígena}$$

Un valor de IS > 1 indica que el compuesto es más selectivo para células cancerosas que para las células normales, lo que es deseable en los tratamientos anticancerígenos. IS = 1, sugiere que el compuesto tiene la misma toxicidad tanto para las células normales como para las cancerosas, lo que no es ideal. IS < 1, indica que el compuesto es más tóxico para las células normales que para las células cancerosas, lo que sería un efecto indeseable.

En la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer, un índice de selectividad se considera de relevancia generalmente cuando es ≥ 10. Esto implica que el compuesto en estudio es al menos 10 veces más tóxico para las células cancerosas que para las células normales, lo que sugiere un potencial para ser un tratamiento eficaz con menores efectos adversos en tejidos sanos. Valores de IS superiores a 10 indican un mayor grado de selectividad, lo que es altamente deseable en el desarrollo de fármacos

anticancerígenos, ya que un índice de selectividad alto minimiza la toxicidad sistémica y mejora la seguridad del tratamiento [71].

4.5. Evaluación del efecto quimio-sensibilizador

Se determinó la capacidad de **MV14** de sensibilizar las células tumorales al quimioterápico cisplatino. Las células T24 y 253J se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos en medio McCoy's 5A suplementado con 10% de SFB a una densidad de 8 x 10^3 células por pocillo en 100 µL de medio de cultivo, se incubaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Las células se co-incubaron en presencia de **MV14** (0,78 y 1,56 µM) y en concentraciones crecientes de cisplatino en un rango de 3,13 a 100 µM, se dejó incubando durante 24 y 48 horas. Las concentraciones elegidas fueron en base a las CI_{50} obtenidas anteriormente, para de esta manera poder evaluar una concentración cercana y otra al doble de la CI_{50}. Cada condición fue evaluada por sextuplicado en al menos 6 ensayos independientes. Posteriormente, la viabilidad celular fue determinada mediante el método de MTT descrito anteriormente. Para determinar si el compuesto **MV14** presenta un efecto sinérgico se calculó el índice de combinación (IC) considerado en el método de Chou-Talalay mediante el software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK) [72]. Para ello, se mantuvieron fijas las concentraciones de **MV14** y se variaron las de cisplatino en una relación 1:4. Los valores de IC se analizaron considerando IC > 1,1, antagonismo, IC = 0,9-1,1, efecto aditivo, IC = 0,3-0,9 sinergismo y IC < 0,3, fuerte sinergismo.

4.6. Estudios del ciclo celular

Se determinó el efecto de **MV14** en el ciclo celular. Este estudio permite analizar y cuantificar el contenido de ADN en las células en diferentes fases del ciclo celular G1, S, G2/M, al marcar las células con el agente intercalante fluorescente ioduro de propidio el cual se une al ADN.

Las células T24 y 253J se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos en medio McCoy's 5A suplementado con 10% de SFB a una densidad de $3x10^5$ células por pocillo en 2 mL de medio de cultivo, se incubaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Luego, las células fueron tratadas con **MV14** a una concentración de 10 µM, cisplatino 10 µM, mitomicina C 10 µM y DMSO al 0,5% en medio de cultivo con 2% de SFB y se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 3 horas. A continuación, las células se recolectaron y se fijaron en etanol al 70% previamente enfriado a -20ºC durante 30 minutos.

Posteriormente, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS 1X. Se filtraron utilizando una malla de 50 μm y se trataron con ARNasa (concentración final de 50 μg/mL) (Sigma, R5503). Finalmente, se tiñeron con ioduro de propidio (concentración final de 50 μg/mL) (Invitrogen, P1304MP) y se incubaron durante 30 min. Cada condición fue evaluada por duplicado en al menos 3 ensayos independientes. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific) colectando 20,000 eventos por muestra, utilizando el contenido de ADN para determinar la fase del ciclo celular. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante two-way ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

4.7. Inducción de la apoptosis celular

Se realizó la puesta a punto de la determinación de la apoptosis celular mediante el marcado con anexina V-FITC y ioduro de propidio (IP). La anexina V-FITC (AV) es una proteína con alta afinidad por los fosfolípidos fosfatidilserina. En las células sanas normales, la fosfatidilserina se localiza en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática. Sin embargo, durante la apoptosis, la membrana plasmática experimenta cambios estructurales que incluyen la translocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la externa (lado extracelular) de la membrana plasmática. La anexina V se usa acoplada a FITC, permitiendo el marcado de las poblaciones celulares que han iniciado el proceso de apoptosis y el análisis mediante citometría de flujo. Por otro lado, el IP es capaz de ingresar a las células de acuerdo con la permeabilidad de la membrana. El IP no penetra en células viables o en apoptosis temprana debido a que la membrana plasmática se encuentra intacta. En cambio, en células que se encuentran en estado de apoptosis tardía o necrosis, la integridad de la membrana se encuentra alterada, lo que permite el ingreso del IP e intercalarse con ácidos nucleicos.

Las células 253J se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 1 x 10^5 células por pocillo en 1 mL de medio McCoy's 5A suplementado con 10% de SFB y se incubaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Los cultivos fueron tratados con **MV14** a 5 y 10 μM, se utilizó camptotecina a 40 μM como control positivo y como control negativo DMSO al 0,5% en medio de cultivo con 2% de SFB y se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron colectadas mediante tripsinización, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se realizó un lavado con PBS 1X frío. Las células fueron resuspendidas en buffer anexina (HEPES 0,01 M, NaCl

0,14 M, $CaCl_2$ 2,5 mM, pH 7,4) a una concentración aproximada entre 1-4 x 10^5 células/mL. Las células fueron marcadas con 5 µL de anexina V-FITC (BD Pharmingen, 51-65874X) y se incubaron durante 15 minutos protegidas de la luz y a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un lavado con buffer anexina, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 300 µL de buffer anexina y se adicionaron 2 µL de ioduro de propidio [250 µg/mL]. Las muestras se mantuvieron en frío hasta el análisis. Cada condición fue evaluada por duplicado en al menos 2 ensayos independientes. Las muestras fueron analizadas mediante citómetro de flujo (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific) colectando 20.000 eventos por muestra. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante two-way ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

4.8. Determinación del efecto genotóxico

4.8.1. Inmunocitoquímica γ-H2AX

Se determinó el efecto genotóxico de **MV14** en células derivadas de cáncer de vejiga T24 y 253J mediante ensayos de inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-γ-H2AX. Este estudio permite la identificación de rupturas de ADN de doble cadena mediante la detección de la fosforilación de la variante histona H2AX en la serina 139 generando foci γ-H2AX. En este ensayo se determinó el rol del ·NO liberado por **MV14** en la generación del daño al ADN a través de la pre-incubación del cultivo con hemoglobina y posterior tratamiento con el compuesto.

Las células T24 y 253J se sembraron a una densidad de 6 x 10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en 500 µL de medio de cultivo McCoy's 5A suplementado con 10% de SFB. Las células se incubaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Luego, 4 pocillos fueron pre-tratados con hemoglobina (100 µM), para posteriormente dar tratamiento a las células con **MV14** a una concentración de 5 y 10 µM durante 3 horas. Se incluyó DMSO al 0,5% como control negativo y SNAP (50 µM) como control positivo. Cada condición se evaluó por duplicado en al menos 4 ensayos independientes. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% en PBS (PAF) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Se retiró la solución fijadora y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se agregó buffer de bloqueo (PBS, Tritón 0,05%, BSA 1%) y se mantuvo en agitación por 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario γ-H2AX

[1/500] (Abcam, ab26350) en buffer de bloqueo en cámara húmeda a 4ºC durante toda la noche.

Luego, se realizaron 3 lavados con buffer de bloqueo en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo secundario IgG goat anti-mouse (DyLight 488) [1/1000] (Abcam, ab96879) y DAPI [1/1000], en buffer de bloqueo, se incubó durante 45 minutos en agitación, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X en agitación durante 5 minutos. Los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos agregando el agente de montaje Prolong Gold Antifade (Invitrogen, P36930), se dejaron reposar durante 3 horas protegidos de la luz y se guardaron a 4ºC. Se tomaron imágenes utilizando un microscopio confocal Zeiss-800. Se analizaron un total de 100 núcleos por condición en el programa ImageJ. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante one-way ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

4.8.2. Ensayo Cometa

Adicionalmente, se evaluó mediante ensayo cometa o electroforesis alcalina unicelular el daño genotóxico de **MV14** en células T24 y 253J [73,74]. El ensayo cometa alcalino nos permite detectar daño al ADN de simple y doble hebra y los sitios álcali lábiles. Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 2 x 10^5 células por placa en medio de cultivo McCoy's 5A suplementado con 10% de SFB, se incubaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Posteriormente, se agregó el compuesto **MV14** a una concentración de 50 μM en medio de cultivo fresco. Se incluyó peróxido de hidrógeno (H_2O_2, 100 μM) como control positivo. Las células se incubaron durante 3 horas a 37ºC y 5% de CO_2.

Luego los cultivos se colectaron mediante tripsinización y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 minutos. El pellet celular fue resuspendido en PBS 1X y se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión (Gibco, #15517-014) al 1,5%, se homogeneizó y se colocó inmediatamente en portaobjetos recubiertos previamente con agarosa de punto de fusión normal (Invitrogen, #15510-019). La agarosa se dejó solidificar reposando a 4ºC durante 15 minutos. Luego, las células fueron lisadas sumergiendo los portaobjetos en buffer de lisis frío (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, NaOH para ajustar a pH 10, 1% Tritón X-100 y 10% DMSO) durante 12 horas a 4ºC. Los portaobjetos se sacaron del buffer de lisis y se realizó un lavado con PBS 1X. Seguido de esto, los portaobjetos se

incubaron en una solución de electroforesis alcalina fría (NaOH 3M, EDTA 100 mM) durante 20 minutos.

La electroforesis se realizó a 25 V durante 20 minutos manteniendo una intensidad de corriente en el rango de 250-300 mA. Las muestras se lavaron tres veces con buffer de neutralización pH 7,5 (Tris-HCl 0,4 M) y se secaron en la estufa a 37ºC. Finalmente, los portaobjetos se tiñeron con 60 µL de bromuro de etidio [10 µg/mL]. Las imágenes de los cometas fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX-81 con un objetivo de 20X. Se analizaron un total de 100 cometas visualmente y se clasificaron en una de las cinco clases según la longitud de la cola de 0 (sin daño) a 4 (daño máximo). El grado de daño en el ADN en el rango de 0 a 400 se calculó usando la ecuación: $\Sigma(n.\alpha)$, donde n es el porcentaje de células en una clase de longitud de cola y α es la clase de longitud de cola [75,76]. Cada condición se evaluó por duplicado en 2 ensayos independientes.

4.9. Ensayos de migración celular

Se evaluó la capacidad del compuesto **MV14** de inhibir la migración de células cancerosas mediante la técnica de migración celular por medio de herida, también conocido como ensayo de herida o *scratch* [77].

Las células T24 y 253J se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos en medio McCoy's 5A suplementado con 10% de SFB a una densidad de 5 x 10^5 células por pocillo en 2 mL de medio de cultivo, se incubaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Pasado este tiempo, el cultivo debe de tener una confluencia del 100% para poder realizar la herida. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS 1X. Luego los cultivos fueron pre-incubados durante 2 horas con mitomicina C a una concentración de 5 µg /mL en medio de cultivo con 1% de SFB. La mitomicina C inhibe la proliferación celular, de esta manera se cuantifica el cierre de la herida por migración únicamente.

Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS 1X. Se agregó 1 mL de PBS y se realizó la herida en la monocapa empleando una punta de P200. Se retiró el PBS y la monocapa se lavó cuidadosamente para retirar los restos celulares desprendidos durante la herida. A continuación, se tomaron imágenes a tiempo 0. Seguido de esto, se agregó medio de cultivo suplementado con 1% de SFB y el compuesto **MV14** a una concentración de 5 y 10 µM, DMSO al 0,5% como control negativo y SAHA (Vorinostat) 10 µM como control positivo. Cada condición fue evaluada por duplicado

en 2 ensayos independientes. Los cultivos fueron incubados durante 17 horas y luego se tomaron imágenes de las heridas utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX-81 con un objetivo de 10X. Se tomaron 6 imágenes por condición en los distintos horarios. Las imágenes se cuantificaron utilizando el programa ImageJ [78] y el porcentaje de cierre de herida se calculó de la siguiente manera:

$$\%\ de\ cierre\ de\ herida\ = \frac{Área\ T_0 - Área\ T_f}{Área\ T_0} \times 100$$

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando one-way ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett.

4.10. Estudios de la expresión de survivina

Se determinó la capacidad de **MV14** para reducir los niveles de survivina en las células derivadas de cáncer de vejiga mediante western blot. Las células T24 y 253J se sembraron en placas de 10 cm en medio McCoy's 5A suplementado con 10% de SFB a una densidad de 5 x 10^5 células en 8 mL de medio de cultivo, se incubaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Luego, las células se trataron con **MV14** a una concentración de 5 y 10 μM, Baicaleína 20 μM como control positivo [79] (Sigma, 465119-100MG) y DMSO al 0.5% y se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 24 horas. Al final del periodo de incubación, se realizaron dos lavados con PBS 1X frío y el scrapping y lisado celular mediante el agregado de 500 μL de buffer Laemmli (Tris HCl 1M, pH 6,8, glicerol, 2-marcaptoetanol, SDS al 10%, azul de bromofenol al 1%) más inhibidores de proteasas (PIC, PMSF). Seguido, se desnaturalizaron a 96ºC durante 10 minutos.

Para la electroforesis de proteínas se prepararon geles de poliacrilamida al 15% y se realizó la corrida electroforética a un voltaje fijo de 110 V y amperaje libre durante 2 horas. Para la inmunotransferencia, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) empleando 350 mA, voltaje libre y a una temperatura de 4ºC durante 1 hora y 15 minutos. Posteriormente, se realizó el bloqueo con BSA al 5% en PBS-Tween 20 al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Luego, se incubó con los anticuerpos primarios anti-survivina de conejo (abcam, ab76424) [1/5000] y tubulina de conejo (abcam, ab15246) [1/200] a 4ºC durante toda la noche con agitación.

A continuación, se realizaron dos lavados con PBS-Tween 20 al 0,1% a temperatura ambiente en agitación durante 10 minutos. Las membranas se incubaron con el anticuerpo

secundario de cabra-anti-conejo HRP (G-21234) [1/5000] durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Las bandas de proteínas se revelaron utilizando el reactivo de detección ECL de quimioluminiscencia (abcam, ab65628) y se tomaron imágenes utilizando el equipo iBright CL1500 Imaging System (Invitrogen, A44114). Cada condición fue evaluada en al menos 5 ensayos independientes. La cuantificación se realizó con el software ImageJ y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante one-way ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

4.11. Determinación del efecto mutagénico

El estudio del posible efecto mutagénico del compuesto **MV14** se llevó a cabo mediante los ensayos preclínicos de toxicidad y mutagenicidad utilizando el test de AMES [80]. Se emplearon las cepas de *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 y *E. coli* WP2 uvrA (pKM101). Las bacterias se cultivaron en medio Oxoid Nº2 (medio de cultivo Oxoid Nº2, Bacto Agar y H_2O Milli-Q) hasta tener un crecimiento exponencial y alcanzar una concentración de 2 x 10^9 bacterias/mL.

En primer lugar, se determinó la toxicidad del compuesto **MV14** utilizando un rango de concentraciones de 0,01-100 µg/placa. Se incluyó DMSO como control negativo y un control de crecimiento bacteriano. El compuesto se incubó durante 1 hora a 37ºC junto con 100 µL de la suspensión bacteriana correspondiente en agar blando (0,5 g de NaCl, 0,6 g de Bacto Agar, 100 mL agua milli-Q) y se agregó una solución de Histidina (100 mM) / Biotina (0,5 mM). Posteriormente, el agar blando se vertió sobre una placa de agar mínimo selectivo (7 g de K_2HPO_4, 2 g de KH_2PO_4, 1 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,25 g de $C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$, 15 g de Bacto Agar y 1,000 mL agua milli-Q) y se dejó solidificar. Una vez solidificado se dejó incubando a 37ºC durante 24 horas.

Posteriormente, se evaluó el posible efecto mutagénico de **MV14**. Se realizaron diluciones al tercio de la mayor concentración utilizada en los ensayos de toxicidad, teniendo un rango de concentraciones de 1-100 µg/placa para cada una de las cepas. Se incluyó DMSO como control negativo, y como controles positivos se utilizaron sustancias específicas para cada cepa bacteriana: i) TA97a: 9-Aminoacridina, ii) TA98: 2-Nitrofluoreno, iii) TA100: Azida de sodio iv) *E. coli* WP2 uvrA: 4-nitroquinolina 1-oxido. El compuesto se incubó por 1 hora a 37ºC con 100 µL de la suspensión bacteriana correspondiente en agar blando y se agregó una solución de Histidina (0,5 mM) / Biotina (0,5 mM). Luego, el agar blando se vertió sobre una placa de agar mínimo selectivo y se

dejó solidificar. Una vez solidificado se dejó incubando a 37ºC durante 48 horas. El número de revertientes fue contado manualmente y se expresó como el promedio de duplicados. Se considera que el compuesto es mutagénico cuando el número de colonias revertientes sea mayor al doble del promedio del control negativo en al menos dos dosis consecutivas.

4.12. Actividad antitumoral *in vivo*

4.12.1. Desarrollo del modelo de cáncer de vejiga murino y tratamiento intravesical con el compuesto MV14

Se evaluó la actividad antitumoral *in vivo* del compuesto **MV14** mediante un modelo de cáncer de vejiga en ratón. El protocolo de trabajo fue evaluado y aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de Facultad de Medicina, bajo el título "Efecto quimioterapéutico de un agente liberador de óxido nítrico contra el cáncer de vejiga" (formulario número 1683). Se utilizaron 15 ratones hembra C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad [81-83]. Para inducir el cáncer de vejiga, 10 animales recibieron BBN al 0,05% (N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina) (TCI, B0938) en el agua de bebida *ad libitum* continuamente por 16 semanas [84]. Un grupo control sin cáncer de N= 5 bebió agua sin BBN durante 16 semanas. Una vez finalizada la inducción del cáncer, se realizaron estudios de resonancia magnética.

A partir de la semana 17 hasta la semana 21, los animales bebieron agua libre de BBN y se realizó el tratamiento intravesical una vez por semana durante 4 semanas consecutivas. Previo a cada instilación, se recolectó la orina de los animales en tubos de 1,5 mL mediante masaje vesical para el posterior análisis de sedimento urinario. Luego, los ratones fueron anestesiados con isofluorano al 3%. La instilación se realizó colocando un catéter de teflón de calibre 24 (0,7 mm de diámetro x ¾ de pulgadas) (NIPRO, CI+2419ISO) en la vejiga a través de la uretra. Luego, a través del catéter con ayuda de una jeringa de 1 mL se administraron las distintas soluciones. Un grupo de ratones control (N=5) fue instilado con 100 µL del vehículo (10% Tween 80, 10% polietilenglicol (PEG), 80% PBS). Otro grupo de ratones (N=5) fue instilado con 100 µL del compuesto **MV14** (1 mg/mL disuelto en vehículo). Los ratones se mantuvieron cateterizados bajo anestesia durante 60 minutos, con un rango de isofluorano entre 1-2%. Debido a que el tratamiento bajo anestesia es prolongado, los animales se colocaron sobre bolsas de semillas

previamente calentadas para ayudarlos a mantener su temperatura corporal y facilitar su rápida recuperación post-anestesia. Para facilitar el contacto de las soluciones con toda la superficie de la vejiga, los ratones fueron girados en un ángulo de 90º cada 15 minutos. Durante la semana 21, una vez concluidas las instilaciones, se realizó un nuevo estudio de resonancia magnética de la vejiga de los animales.

Previo al sacrificio, se realizó la recolección de orina para la cuantificación de la citoquina IL-17A. Luego los animales fueron anestesiados con una dosis de 50 mg/kg de una solución de Ketamina-Xilacina (0,05 mL Xilacina al 10%, 1 mL Ketamina, 9 mL H_2O). Se tomaron muestras de sangre mediante punción retroorbital, se recolectó sangre completa en tubos con anticoagulante EDTA (1,8 mg/mL) para la cuantificación de células sanguíneas y en tubos sin anticoagulante de 1,5 mL para la obtención de suero, para la determinación de los niveles de citoquina IL-17A. Finalmente, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se realizaron estudios de necropsia en todos los animales y se recolectaron las vejigas y riñones para su posterior estudio histopatológico.

4.12.2. Estudios de imagen por Resonancia Magnética (MRI)

Para realizar la adquisición de imágenes por resonancias magnéticas los animales fueron anestesiados con isofluorano al 4% administrado en un flujo constante de oxígeno de 2 L/min. Una vez anestesiados, fueron colocados en posición prona sobre la plataforma del escáner. La adquisición se realizó utilizando un equipo nanoScan PET/MRI3T(Mediso®). Para la obtención de las imágenes, se utilizó MRI con una secuencia de gradiente 3D ponderado en T1 axial. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: el campo de visión (FOV) se estableció en 42 x 32 mm, con un grosor de corte (th) de 0,4 mm. Se realizaron 4 excitaciones (NEX), con un tiempo de repetición (TR) de 25 y un tiempo de eco (TE) de 4. La resolución espacial en el plano (sp) fue de 0,17 x 0,16 mm. El tiempo total de adquisición fue de 30 minutos 17 segundos en el cual los animales permanecieron bajo anestesia con isofluorano al 2% y se obtuvo un total de 94 cortes (*slices*).

4.12.3. Análisis de Orina

Se realizó el registro de pH de la orina utilizando tira reactiva. La orina se centrifugó a 4.500 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante conservando un volumen de

50-100 µL para resuspender el sedimento. Luego, para el sedimento en fresco se tomó una gota y se colocó en un portaobjetos limpio y cuidadosamente se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio iniciando con un objetivo 10X y luego con 40X. Por otra parte, se realizó un extendido de orina para el cual se tomó una gota y se colocó en un portaobjetos limpio, se usó el borde de otro portaobjetos para esparcir la gota en un extendido fino (similar a la preparación de un frotis sanguíneo) y se dejaron secar al aire. Finalmente, las muestras se fijaron con metanol durante 2 minutos y se tiñeron durante 30 minutos con colorante Giemsa (PAA, S11-019) diluido 1:20 con agua destilada. Los extendidos se observaron al microscopio (Optika Italy, B-193PL) a 40X y 100X.

4.12.4. Cuantificación de células sanguíneas mediante biometría hemática

Se recolectó la sangre de los animales en tubos con anticoagulante EDTA (1,8 mg/mL). Las muestras se enviaron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República donde se cuantificó las poblaciones de neutrófilos, linfocitos y monocitos.

4.12.5. Cuantificación de la citoquina pro-inflamatoria (IL-17A) en suero y orina mediante ELISA

Se recolectó la sangre de los animales en tubos de 1,5 mL estériles sin anticoagulante. Las muestras se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4.500 rpm durante 10 minutos. El suero se separó del paquete globular y se almacenó en freezer a -80ºC hasta el análisis. La orina se recolectó en tubos de 1,5 mL estériles, se centrifugó a 4.500 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se almacenó en freezer a -80ºC hasta el análisis. La cuantificación de la citoquina inflamatoria IL-17A en suero y orina se realizó utilizando el kit Mouse IL-17A ELISA MAX Deluxe (BioLegend, 432504) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se agregaron 100 µL de las muestras de suero y orina en una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura (anticuerpo monoclonal de rata específico para IL-17A de ratón), se incubó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 4 lavados con buffer de lavado (PBS 1X, 0.05% Tween-20) y se agregaron 100 µL del anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal de rata biotinilado anti-IL-17A de ratón) y se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Luego de esto, se realizaron 4 lavados con buffer de lavado y se agregaron 100 µL de solución de avidina-

HRP a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con buffer de lavado de 1 minuto y se agregaron 100 µL de solución sustrato TMB (solución A+B en proporción 1:1) y se incubó durante 20 minutos en oscuridad. Finalmente, para detener la reacción se agregaron 100 µL de solución de detención (solución ácida, H_2SO_4 2 N) y se realizó la lectura de la absorbancia a 450 nm.

4.12.6. Estudios histopatológicos

Se recolectaron las vejigas y los riñones de los animales para estudios histopatológicos. Los órganos una vez extraídos fueron lavados con solución salina y se colocaron sobre papel absorbente para retirar el exceso de líquido. Luego, se tomó registro del peso y la medida y se fijaron en una solución tamponada de formalina al 10%. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio Diagnóstico SRL en donde se realizaron laminillas con cortes histológicos y fueron teñidos con tinción hematoxilina-eosina. Las laminillas fueron digitalizadas en el escáner Motic EasyScan One con aumento 4X y 10X.

5. Resultados y Discusión

5.1. Síntesis química

El compuesto **MV14** se preparó siguiendo la ruta sintética descrita en la Figura 14 a continuación. Se consideraron algunos de los principios de la química verde para el rediseño de la ruta sintética, obteniendo un rendimiento global de 22%. Se consideraron específicamente el principio 1, que aborda la prevención al enfatizar que es preferible evitar la generación de desechos en lugar de tratarlos una vez formados, y el quinto principio, que sugiere evitar el uso de sustancias auxiliares como los disolventes y, en caso de ser necesario, utilizar aquellos que sean benignos. Además, se tuvieron en cuenta los principios 6 y 9, buscando que las reacciones se llevaran a cabo a temperatura ambiente y en condiciones de catálisis, respectivamente.

Se comenzó con la protección del grupo amina de etanolamina por tratamiento con dicarbonato de di-*tert*-butilo (Boc_2O) en agua [85], para obtener **2**, el cual se hizo reaccionar con el furoxano **3** [63] en presencia de NaOH (ac.) a baja temperatura [86], para dar el compuesto **MV14** (R: 22%).

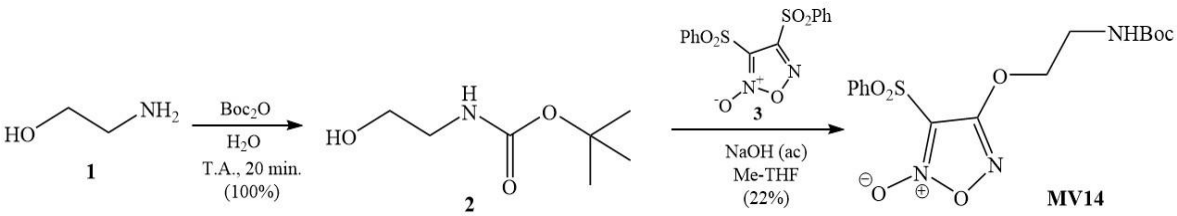

Figura 14. Esquema de la ruta sintética para obtener el compuesto **MV14.**

5.2. Estudios fisicoquímicos

5.2.1. Estudios de estabilidad y lipofilia

La estabilidad de un compuesto en diferentes condiciones es crucial para garantizar su eficacia y seguridad. La evaluación de la estabilidad en un rango de pH biológicamente relevante es particularmente importante, ya que se puede asemejar al posible comportamiento del fármaco en distintos entornos corporales como el estómago (pH bajo), sangre (pH neutro) y tracto urinario (pH variable). Por esto, la estabilidad de **MV14** en agua y en soluciones tampón dentro de un rango de pH biológicamente relevante (pH 4 - 8), a temperatura ambiente durante 1, 2 y 24 horas, fue evaluada mediante cromatografía en capa fina (TLC) y observada bajo luz ultravioleta.

Los resultados obtenidos en la Figura 15 nos sugieren que **MV14** es estable en todas las condiciones ensayadas. **MV14** mostró estabilidad completa, sin degradación detectable por TLC dentro de la primera hora. A las 2 horas no se observó ningún cambio en la integridad del compuesto, lo que sugiere una estabilidad sostenida a corto plazo. Incluso después de 24 horas, **MV14** permaneció intacto en todas las condiciones de pH estudiadas, lo que nos estaría indicando una estabilidad robusta a largo plazo en medios acuosos y tamponados.

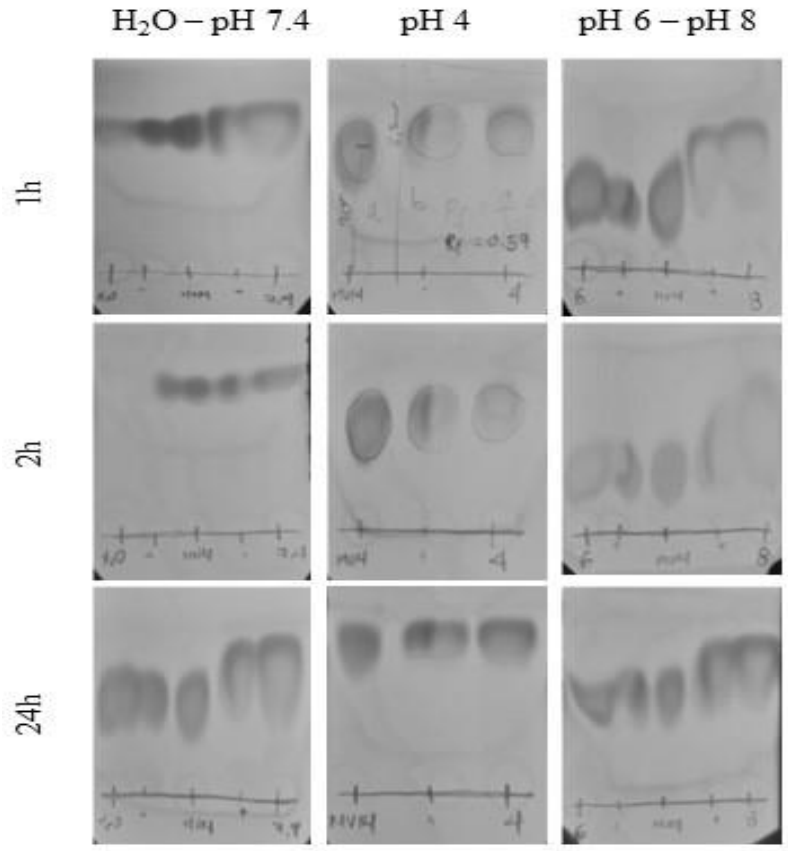

Figura 15. Imágenes representativas de las cromatografías de TLC para la evaluación de la estabilidad de **MV14** a distintos tiempos y distintos pH.

La estabilidad que **MV14** presenta en un rango de pH biológicamente similar al del interior de la vejiga desde neutro a ligeramente ácido, nos sugiere que el compuesto podría mantener su eficacia en diferentes ambientes fisiológicos garantizando una acción prolongada y consistente.

Por otro lado, la evaluación de la lipofilia en el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos es un paso fundamental ya que ayuda a predecir el posible comportamiento que tendrá en el cuerpo. En el contexto del cáncer de vejiga, las terapias intravesicales buscan minimizar la absorción sistémica para reducir posibles efectos secundarios. La evaluación de la lipofilia de un compuesto que será administrado intravesicalmente ayudará a predecir su comportamiento, podrá influir en la penetración celular, la distribución intravesical, la retención en la vejiga, la solubilidad y la reducción de la toxicidad sistémica. Es por esto que un adecuado balance lipofílico es fundamental para asegurar que el compuesto actúe de manera eficaz y segura en el entorno específico de la vejiga.

Para esto, la lipofilia (XlogP3) de **MV14** fue estudiada utilizando la herramienta online SwissADME [64]. En este estudio, se incluyeron fármacos de referencia utilizados en la práctica clínica para el tratamiento intravesical del cáncer de vejiga (Mitomicina C y Gemcitabina) mostrados en la Tabla 1. El compuesto **MV14** tiene un peso molecular de 389,39 g/mol y presentó una lipofilia de 2,13, la cual fue comparada con la de los fármacos de referencia.

Agente	Peso molecular (g/mol)	Lipofilia (XLogP3)
Paclitaxel	853,90	2,50
MV14	389,39	2,13
Mitomicina C	334,33	-0,40
Gemcitabina	263,20	-1,50

Tabla 1. Comparativa de peso molecular y lipofilia del compuesto **MV14** con fármacos de referencia utilizados en la práctica clínica para el tratamiento intravesical del cáncer de vejiga.

El paclitaxel, es un agente quimioterapéutico utilizado en el tratamiento intravesical, este fármaco tiene un alto peso molecular y presenta una lipofilia elevada. Su alta lipofilia facilita la penetración en las células tumorales, lo cual es beneficioso para asegurar que el fármaco llegue al interior del tumor. Pero su alta lipofilia podría aumentar el riesgo de absorción sistémica, lo que podría reducir su concentración en la vejiga y aumentar el riesgo de efectos secundarios. Sin embargo, su elevado peso molecular podría limitar su capacidad para difundir rápidamente a través del epitelio de la vejiga.

El compuesto **MV14** tiene un peso molecular (389,39 g/mol) y presentó una lipofilia (2,13) menor que paclitaxel, pero superior que mitomicina C y gemcitabina. Este peso molecular y esta lipofilia podrían permitir que **MV14** tenga un equilibrio entre la retención en la vejiga y su capacidad para penetrar en las células tumorales. En comparación con los fármacos utilizados de manera intravesical en la terapia del cáncer de vejiga, **MV14** presenta un perfil intermedio, lo que sugiere que el compuesto presenta una mejor penetración en el tejido vesical que los fármacos de mayor peso molecular, como el paclitaxel, y una mejor retención y acción prolongada en la vejiga en comparación con fármacos más hidrofílicos como mitomicina C y gemcitabina.

La mitomicina C es un agente quimioterapéutico con un peso molecular inferior a **MV14** y con baja lipofilia, lo que favorece su solubilidad en medios acuosos. Esta característica puede ser beneficiosa para su administración intravesical, ya que favorece su solubilidad en orina y mejora su distribución en la vejiga. Sin embargo, la baja lipofilia también puede limitar la penetración en las membranas celulares y tejidos más profundos, lo que podría reducir su eficacia para el tratamiento de tumores invasivos.

La gemcitabina presenta bajo peso molecular y una lipofilia muy baja, lo que sugiere una excelente solubilidad en medio acuoso. La baja lipofilia puede ser beneficiosa ya que reduce la posibilidad de absorción sistémica permitiendo que el fármaco permanezca en la vejiga. Esta característica puede ser beneficiosa, pero a su vez limita la capacidad del fármaco para penetrar las células tumorales, especialmente aquellas que se encuentran en capas más profundas. Esta limitación se puede contrarrestar con el bajo peso molecular que presenta el fármaco, ya que esto facilita su difusión a través de las capas celulares de la vejiga, lo que permite que la gemcitabina penetre de manera efectiva en las capas superficiales del urotelio.

En base a lo anterior, podemos inferir que el compuesto **MV14** presenta un equilibrio entre peso molecular y lipofilia el cual le permitiría una mejor retención y penetración en las células tumorales, minimizando los efectos secundarios sistémicos. Aunque estos datos preliminares sobre nuestro compuesto son prometedores, existe la necesidad de realizar estudios adicionales con el objetivo de poder confirmar que no hay absorción sistémica y su seguridad a largo plazo en la administración intravesical.

5.2.2. Liberación de óxido nítrico

El óxido nítrico es una molécula clave en muchas funciones fisiológicas y la capacidad de un compuesto para liberarlo es de relevancia farmacológica, ya que puede influir en el tratamiento de enfermedades como lo es el cáncer, donde el ·NO desempeña un papel crítico. Se determinó la liberación de ·NO de **MV14** en medio fisiológico mediante la técnica de Griess. El compuesto **MV14** (100 μM) se incubó en una solución PBS/Metanol con exceso de cisteína (5 veces más en relación con el compuesto **MV14**) durante 1, 3 y 6 horas a 37ºC. Se utilizó el compuesto SNAP como control positivo ya que es un compuesto estándar conocido por su capacidad de liberar ·NO de manera controlada.
Los resultados obtenidos nos indican que el compuesto **MV14** es un potente liberador de ·NO, presentando una liberación similar al de SNAP (Figura 16). Los resultados evidencian que **MV14** presenta un importante aumento en la liberación de ·NO dentro de la primera hora de incubación, pero no superando la liberación por parte del compuesto SNAP, lo que podría estar indicando que **MV14** libera el ·NO de manera más controlada. Además, aunque **MV14** presenta una liberación de ·NO menor que SNAP en la primera hora de incubación, la liberación detectada por parte de nuestro compuesto en estudio es relevante ya que nos indica que la molécula es capaz de liberar ·NO en condiciones fisiológicas. A las 3 horas de incubación podemos observar un incremento en la liberación de ·NO por parte de **MV14**, lo cual nos estaría sugiriendo un proceso de liberación gradual y sostenida por parte de la molécula, teniendo un comportamiento muy similar al de SNAP, el cual presenta un pico máximo en su liberación a las 3 horas de incubación. A las 6 horas de incubación, la liberación de ·NO de **MV14** sigue siendo efectiva, aunque inferior a lo registrado a las 3 horas de incubación, comportamiento muy similar al del control positivo SNAP.

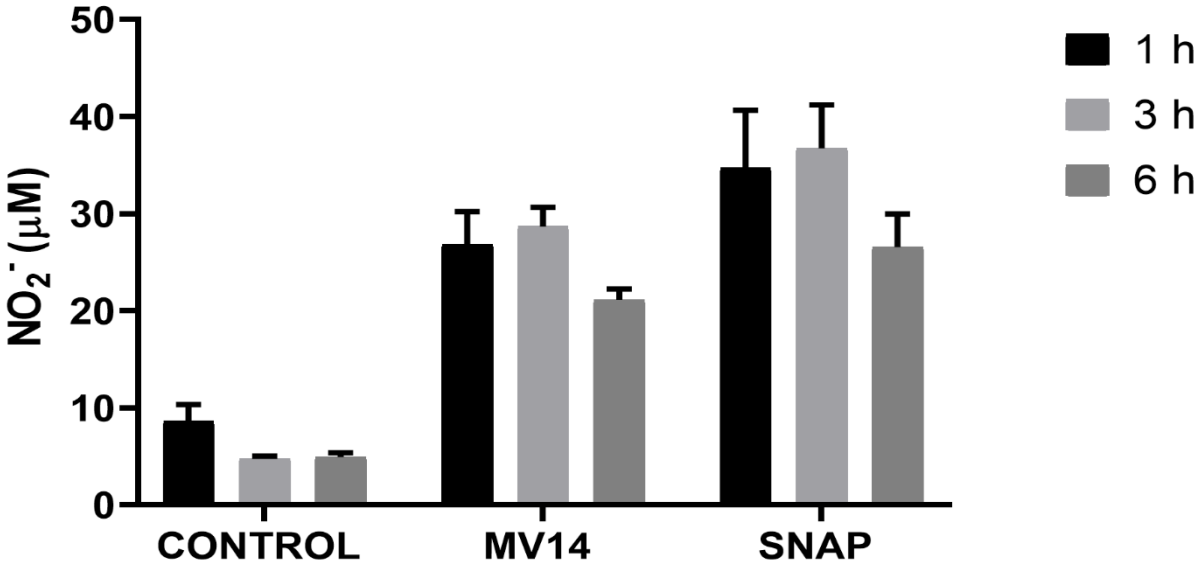

Figura 16. Liberación de óxido nítrico de **MV14** cuantificado por la técnica de Griess. El gráfico presenta la media ± desviación estándar.

Los resultados obtenidos en este estudio nos sugieren que **MV14** es un liberador eficaz de ·NO con un perfil de liberación muy similar al del liberador comercial SNAP. Estas características observadas en **MV14** nos sugieren que el compuesto podría tener un gran potencial en situaciones donde se necesita una liberación ·NO controlada y sostenida en el tiempo, como lo es en las terapias anticancerígenas, reduciendo los posibles efectos secundarios que se podrían presentar por una liberación más rápida e incontrolada.

5.3. Citotoxicidad por MTT

5.3.1. Citotoxicidad en células derivadas de cáncer de vejiga T24 y 253J

El estudio de la citotoxicidad es una herramienta fundamental que permite evaluar la capacidad de un fármaco o compuesto para inducir la muerte celular en líneas celulares tumorales. Se realizaron estudios de viabilidad celular por el método de MTT en las líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga T24 y 253J en presencia del compuesto **MV14,** utilizando cisplatino y mitomicina C como controles positivos y DMSO al 0,5% como control vehículo. La determinación de la citotoxicidad se realizó empleando un rango de concentraciones de **MV14** (0,09 – 12,5 μM), de cisplatino (3,13 - 200 μM), y de mitomicina C (6,25 – 200 μM) a diferentes tiempos 24, 48 y 72 h.

Los gráficos de viabilidad celular (Figura 17) muestran el porcentaje de células viables después del tratamiento con diferentes concentraciones de los compuestos a distintos tiempos en función del tiempo de incubación. Los resultados indican que **MV14** posee una actividad citotóxica a partir de la concentración más baja evaluada, 0,09 µM, generando un 100% de toxicidad desde 6,25 µM en ambas líneas celulares. Las curvas de viabilidad para **MV14** muestran una disminución pronunciada en la viabilidad celular con el aumento de la concentración del compuesto, lo cual refleja su alta actividad citotóxica en ambas líneas celulares. Las curvas para los fármacos de referencia cisplatino y mitomicina C requieren mayores concentraciones para alcanzar los porcentajes de inhibición celular que presenta **MV14**, por lo que podemos inferir que la potencia de estos fármacos es inferior a la de **MV14**.

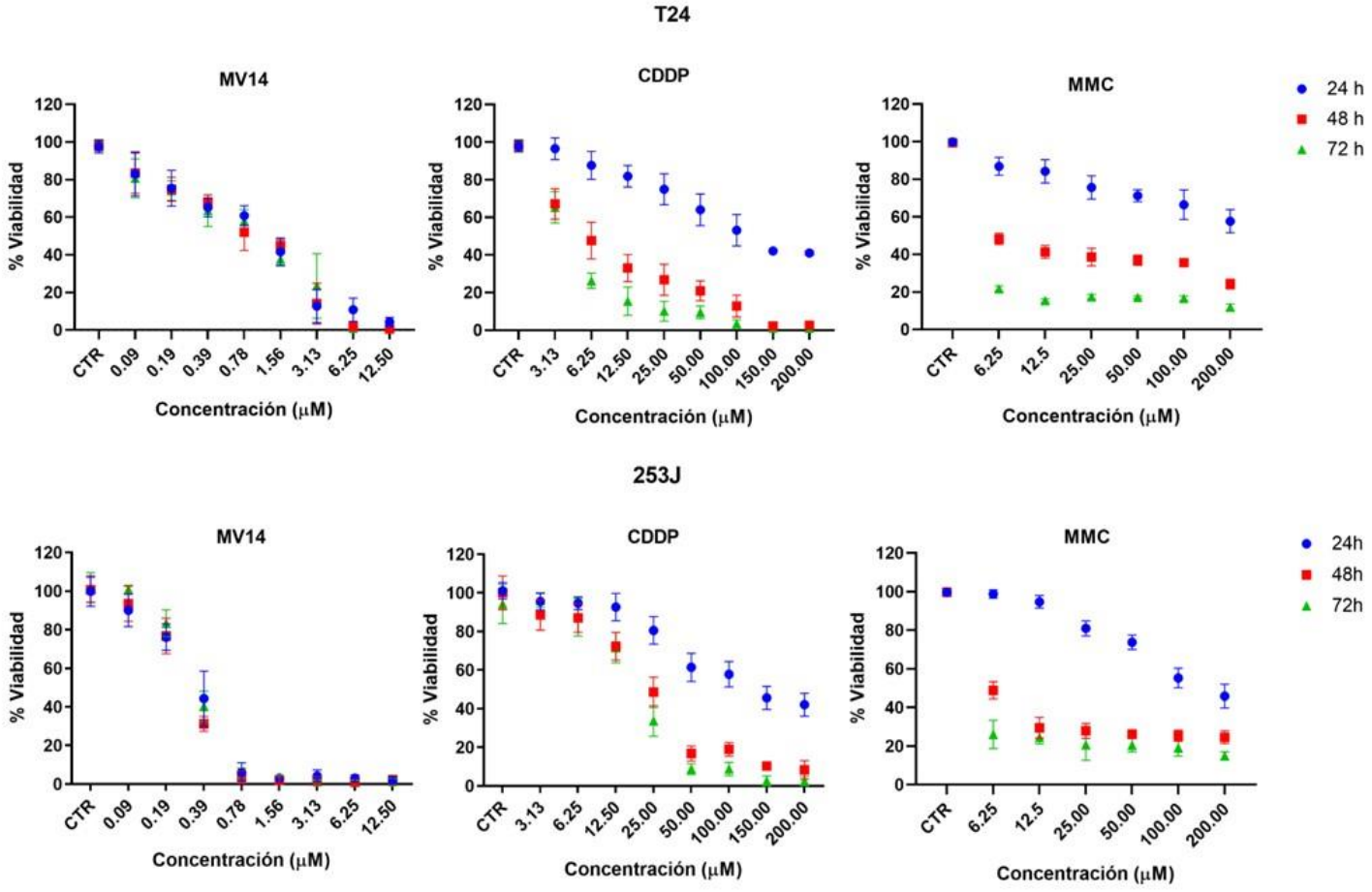

Figura 17. Curvas de porcentaje de viabilidad celular en función de concentraciones crecientes de **MV14**, cisplatino y mitomicina C para las líneas celulares T24 y 253J a 24 h (azul), 48 h (rojo) y 72 h (verde) de incubación. Las barras nos indican el desvío estándar de 4 ensayos independientes.

A través de las curvas dosis-respuesta, determinamos los valores de CI_{50} de **MV14** y de los respectivos fármacos de referencia para cada línea celular a diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas) (Tabla 2). Los resultados obtenidos muestran que **MV14** presenta una actividad citotóxica mayor en ambas líneas celulares comparado con los fármacos de referencia, ya que los valores de CI_{50} son significativamente más bajos que las de los quimioterápicos convencionales. En la línea celular T24, los valores de la CI_{50} de **MV14** tienden a disminuir ligeramente a medida que aumenta el tiempo de incubación, lo que indica que el compuesto afecta la viabilidad de las células cancerígenas y estas no logran recuperarse luego del tratamiento. Los valores de CI_{50} correspondientes a cisplatino y mitomicina C disminuyen significativamente con el tiempo, lo cual podría estar relacionado con su mecanismo acción. Sin embargo, la CI_{50} de **MV14** es muy inferior a la de los quimioterápicos, lo que demuestra que **MV14** es aproximadamente 100 veces más potente que cisplatino y 200 veces más que mitomicina C a las 24 horas en esta línea celular. Para la línea celular 253J, observamos que **MV14** mantiene los valores de la CI_{50} muy bajos y constantes, sugiriendo una alta eficacia y estabilidad en la actividad citotóxica y que las células no logran una recuperación con el tiempo. Al igual que con la línea celular T24, en esta línea celular los valores de la CI_{50} de cisplatino y mitomicina C son inicialmente altos y disminuyen con el tiempo, pero permanecen muy por encima de los valores de **MV14**. Esto nos demuestra que **MV14** es 424 veces más potente que cisplatino y 525 veces más que mitomicina C a las 24 horas en la línea celular 253J.

CI_{50} (µM)				
Compuesto	**Línea celular**	**24 horas**	**48 horas**	**72 horas**
MV14 (µM)	T24	0,88 ± 1,80	0,72 ± 1,49	0,69 ± 1,48
	253J	0,27 ± 1,42	0,27 ± 1,37	0,25 ± 1,30
Cisplatino (µM)	T24	92,07 ± 1,75	6,83 ± 1,72	3,36 ± 1,69
	253J	114,50 ± 1,78	21,34 ± 1,66	18,06 ± 1,51
Mitomicina C (µM)	T24	191,00 ± 1,42	12,43 ± 1,32	2,45 ± 1,33
	253J	141,70 ± 1,73	7,68 ± 1,34	4,04 ± 1,22

Tabla 2. Valores de CI_{50} (µM) del compuesto **MV14** y los fármacos de referencia cisplatino y mitomicina C en las líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga.

5.3.2. Citotoxicidad en células derivadas urotelio SV-HUC-1

Posteriormente, se evaluó la toxicidad del compuesto **MV14** sobre la línea celular de vejiga no cancerígena SV-HUC-1. La determinación de la citotoxicidad se realizó empleando un rango de concentraciones de **MV14** (0,39 – 12,5 μM), de cisplatino (3,13 - 100 μM), y de mitomicina C (6,25 – 200 μM) a diferentes tiempos 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular fue determinada por el método MTT.

En base a los resultados obtenidos, podemos observar que el compuesto **MV14** afecta la viabilidad celular de los cultivos de células no cancerígenas (Figura 18). Así mismo, los fármacos de referencia presentan actividad citotóxica. Para el fármaco cisplatino, las curvas de viabilidad probablemente muestran una disminución más gradual en la viabilidad en las primeras 24 horas, y se observa una mayor caída en la viabilidad a las 48 y 72 horas. Este comportamiento nos estaría indicando que, aunque inicialmente el cisplatino es menos tóxico, su toxicidad incrementa con el tiempo. Para mitomicina C tenemos resultados similares, las curvas nos muestran una alta viabilidad celular a las 24 horas, seguida de una rápida disminución a las 48 y 72 horas. Esto sugiere que la mitomicina C inicialmente es menos perjudicial para las células no cancerígenas, pero se convierte en un agente altamente tóxico a mayor tiempo de exposición.

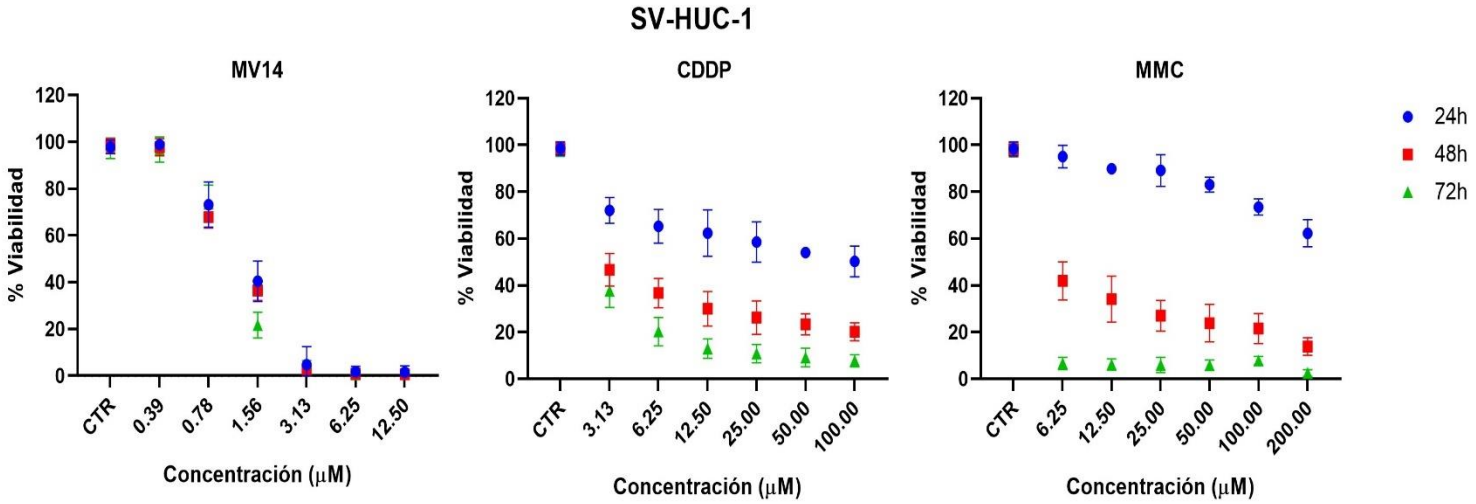

Figura 18. Curvas de porcentaje de viabilidad celular en función de concentraciones creciente de **MV14**, cisplatino y mitomicina C para la línea celular SV-HUC-1 a 24 h (azul), 48 h (rojo) y 72 h (verde). Las barras indican el desvío estándar sobre cada punto.

Se determinaron los valores de la CI_{50} (Tabla 3) de los compuestos en la línea celular de vejiga SV-HUC-1. En los resultados obtenidos, podemos observar que los valores de la

CI_{50} para **MV14** se mantienen constantes alrededor de 1 μM a los diferentes tiempos de incubación, lo que nos indica que mantiene una actividad citotóxica constante contra las células normales de vejiga. Así mismo, podemos destacar que para lograr la misma inhibición en esta línea celular en comparación con las células cancerígenas se necesitaría una mayor concentración del compuesto. Para el fármaco cisplatino, observamos que los valores de la CI_{50} disminuyen con el tiempo. Este comportamiento, comparado con **MV14**, nos muestra que el cisplatino necesita más tiempo para alcanzar una citotoxicidad significativa en células normales, lo cual sería consistente con su mecanismo de acción, ya que al ser un agente alquilante, la célula dentro de las primeras 24 horas estaría tratando de reparar el daño o bien llevar a cabo el proceso de muerte celular programada. La mitomicina C fue el fármaco que presentó valores de la CI_{50} extremadamente altos a las 24 horas, comparado con **MV14** y cisplatino, pero estos valores disminuyeron significativamente en el tiempo. Esto nos estaría indicando que este fármaco, si bien es el menos tóxico para las células normales dentro de las primeras 24 horas, su toxicidad aumenta drásticamente con el tiempo.

CI_{50} (μM)			
Compuesto	**24 horas**	**48 horas**	**72 horas**
MV14 (μM)	1,06 ± 1,34	1,07 ± 1,34	1,05 ± 1,27
Cisplatino (μM)	25,24 ± 1,24	4,23 ± 1,44	1,87 ± 1,62
Mitomicina C (μM)	286,00 ± 1,57	7,65 ± 1,33	0,63 ± 1,24

Tabla 3. Valores de la CI_{50} (μM) del compuesto **MV14** y los fármacos de referencia cisplatino y mitomicina C sobre la línea celular de vejiga SV-HUC-1.

5.4. Índice de Selectividad

Se determinó el índice de selectividad del compuesto **MV14** hacia las líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga T24 y 253J. El índice de selectividad (IS) es una medida que se utiliza para determinar la capacidad de un compuesto para ser tóxico específicamente hacia las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas. Por lo tanto, cuanto mayor sea el valor del índice de selectividad, mayor será la capacidad del compuesto para afectar la viabilidad selectivamente de las células cancerosas.

En primer lugar, podemos destacar que el IS (Tabla 4) del compuesto **MV14** para las líneas celulares T24 y 253J se mantienen a lo largo del tiempo entre las 24 y 72 horas. Asimismo, podemos apreciar que los IS son superiores a los obtenidos por los fármacos de referencia cisplatino y mitomicina C. Los valores del IS para cisplatino nos indican una baja selectividad hacia células cancerígenas, es decir, que el quimioterápico presenta citotoxicidad hacia las células no cancerígenas. En particular, para la línea celular T24, la selectividad del cisplatino aumenta levemente a medida que aumenta el tiempo de incubación. Si comparamos los valores de IS de **MV14** con cisplatino, observamos que el IS de **MV14** es mayor para los 3 tiempos de incubación, siendo el **MV14** entre 2 y 4,5 veces más selectivo que cisplatino. Por otra parte, para la línea celular 253J el IS del cisplatino decae hacia las 72 horas. Esto podría estar en relación con lo descrito por Maruyama y col., 2012 [87] quien describe una resistencia a la apoptosis inducida por el cisplatino en la línea celular 253J. Algo importante a destacar es que el compuesto **MV14** presentó una elevada selectividad hacia la línea celular 253J resultando 43 veces más selectivo que el cisplatino luego de 72 horas de incubación.

Con respecto a mitomicina C, observamos que muestra un IS moderado en las primeras 24 horas hacia las líneas celulares T24 y 253J. Sin embargo, la selectividad de este quimioterápico disminuye considerablemente cuando estos cultivos son expuestos a mayores tiempos de incubación con el mismo. Esto se debe a que el valor de la CI_{50} de mitomicina C sobre la línea celular no cancerígena cae de 283 μM a las 24 horas a 0,63 μM a las 72 horas de incubación. Si comparamos los valores de IS de **MV14** con mitomicina C, observamos que para la línea celular T24 ambos compuestos poseen un IS similar a las 24 horas, sin embargo, hacia las 72 horas **MV14** es casi 6 veces más selectivo que mitomicina C. Esto podría estar relacionado con lo descrito por Pan CW y col., 2009 [88] quien describe una resistencia a la muerte celular inducida por mitomicina C en la línea celular T24. Por otro lado, en cuanto a la línea celular 253J observamos que **MV14** es casi dos veces más selectivo que mitomicina C a las 24 horas, esto se hace más significativo a las 72 horas donde **MV14** muestra ser casi 27 veces más selectivo que mitomicina C.

Índice de Selectividad (IS)				
Compuesto	**Línea celular**	**24 horas**	**48 horas**	**72 horas**
MV14	T24	1,1	1,48	1,53
	253J	3,98	4,06	4,29
Cisplatino	T24	0,27	0,62	0,56
	253J	0,22	0,20	0,10
Mitomicina C	T24	1,50	0,62	0,26
	253J	2,02	1,00	0,16

Tabla 4. Índice de selectividad (IS) determinado como la CI_{50} SV-HUC-1 / CI_{50} línea celular cancerosa.

Por lo tanto, los resultados obtenidos nos sugieren que el compuesto **MV14** presenta selectividad hacia células cancerosas, con particular relevancia en la línea celular 253J. Este comportamiento es especialmente notable cuando se comparan los índices de selectividad a lo largo del tiempo, donde **MV14** supera a los fármacos de referencia cisplatino y mitomicina C. El cisplatino mostró una baja selectividad, lo que es consistente con su conocido perfil de citotoxicidad en células no cancerígenas y sus efectos secundarios en la práctica clínica. Por otro lado, aunque mitomicina C presentó un IS moderado en las primeras 24 horas, la selectividad disminuye con el tiempo, lo que podría limitar su eficacia a largo plazo. Finalmente hay que destacar que **MV14** no solo mantiene su selectividad, sino que la incrementa con mayores tiempos de incubación, lo que podría ser prometedor para el tratamiento del cáncer de vejiga.

5.5. Evaluación del efecto quimiosensibilizador

El ensayo de quimiosensibilización es una técnica importante en la investigación oncológica, ya que permite evaluar la capacidad de un nuevo compuesto en estudio para potenciar los efectos de la quimioterapia de uso habitual sobre las células cancerosas. Estos ensayos son de relevancia porque, uno de los mayores desafíos en el tratamiento del cáncer es la resistencia que algunas células tumorales desarrollan frente a los agentes quimioterapéuticos convencionales. Esta resistencia puede limitar la efectividad del tratamiento y favorecer la progresión de la enfermedad. Conocer que un nuevo compuesto en estudio tiene la capacidad de sensibilizar a las células cancerosas a la quimioterapia, podría llevar al desarrollo de tratamientos combinados más eficaces, permitiendo reducir las dosis de quimioterapia y con ello reducir los efectos secundarios.

Para determinar si **MV14** sensibiliza las células tumorales al quimioterápico cisplatino, se determinó la viabilidad celular de cultivos expuestos a la combinación de ambos compuestos durante 24 y 48 horas. Se evaluaron dos concentraciones de **MV14** (0,78 y 1,56 µM) la cuales se combinaron con concentraciones crecientes de cisplatino (3,13 - 100 µM). La viabilidad fue determinada por el método de MTT. Posteriormente, el cálculo del índice de combinación (IC) se realizó a través del método de Chou-Talalay empleando el programa CalcuSyn, donde los valores obtenidos se analizaron considerando un IC > 1,1, como efecto antagónico, IC = 0,9-1,1, efecto aditivo, IC = 0,3-0,9 sinergismo y IC < 0,3, fuerte sinergismo.

Los resultados obtenidos (Figura 19) nos muestran que la viabilidad celular disminuye en ambas líneas celulares después del tratamiento combinado de **MV14** con cisplatino. En la línea celular T24 podemos observar que **MV14** logra sensibilizar las células a cisplatino, ya que el porcentaje de viabilidad disminuye favorablemente con el aumento en la concentración de ambos compuestos y esta disminución se mantiene a lo largo del tiempo. En la línea 253J observamos que la combinación de **MV14** con cisplatino muestra una reducción mayor en la viabilidad en comparación con la línea celular T24. Podemos observar que la viabilidad celular disminuye considerablemente cuando el cisplatino está en combinación con **MV14**, presentando un efecto más pronunciado que cuando se encuentra solo. Estos resultados nos estarían indicando que el compuesto **MV14** en combinación con cisplatino logra reducir la viabilidad en líneas celulares, presentando un efecto más pronunciado en la línea celular 253J.

Observando los resultados obtenidos del cálculo de IC (Tabla 5) podemos inferir que para la línea celular T24 a las combinaciones más bajas de cisplatino (3,13 y 6,25 µM) se observa un efecto antagónico en combinación con ambas concentraciones de **MV14.** Sin embargo, cuando **MV14** se combina con el rango de concentraciones de cisplatino entre 12,5 y 100 µM, se observa un efecto sinérgico a las 24 horas de incubación. A las 48 horas de incubación podemos observar un efecto sinérgico en la mayoría de las concentraciones de cisplatino en combinación con **MV14.**

Para la línea celular 253J, en la combinación de **MV14** (0,78 µM) y cisplatino a las 24 horas de incubación observamos principalmente un efecto antagónico en casi todas las concentraciones, excepto en las dos concentraciones más altas (50 y 100 µM) en las cuales se observa un efecto sinérgico, mientras que para la combinación de **MV14** (1,56 µM) y cisplatino se observa un fuerte sinergismo en todas las concentraciones. A las 48

horas se observa un fuerte sinergismo en todas las combinaciones ensayadas lo cual es consistente con los resultados de viabilidad para la combinación de ambos compuestos observados para esta línea celular (Figura 19).

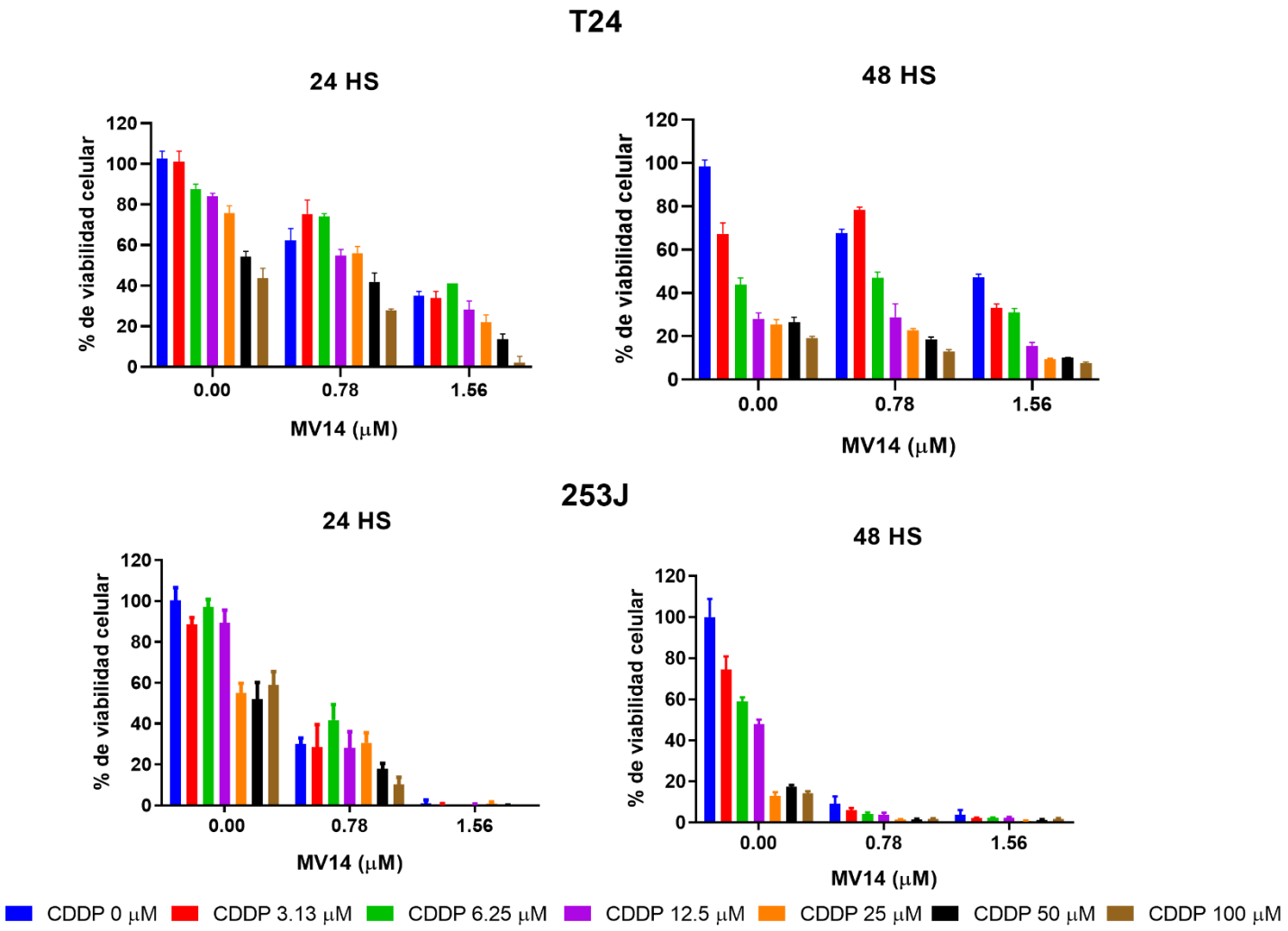

Figura 19. Porcentaje de viabilidad determinado por el efecto combinado entre el compuesto **MV14** y cisplatino en líneas celulares T24 y 253J a 24 y 48 horas.

Índice de Combinación (IC)					
		T24		253J	
MV14 (µM)	**Cisplatino (µM)**	**24 h**	**48 h**	**24 h**	**48 h**
0,78	**3,13**	1,11	1,96	1,25	0,06
	6,25	1,14	0,79	2,03	0,04
	12,5	0,69	0,65	1,28	0,04
	25	0,83	0,48	1,47	0,02
	50	0,71	0,45	0,88	0,02
	100	0,67	0,46	0,55	0,02
1,56	**3,13**	1,21	0,80	0,06	0,02
	6,25	1,18	0,84	0,01	0,02
	12,5	0,78	0,64	0,04	0,02
	25	0,71	0,37	0,11	0,01
	50	0,66	0,34	0,01	0,01
	100	0,46	0,34	0,001	0,02

Tabla 5. Valores del índice de combinación determinado por el método Chou-Talalay a través del programa CalcuSyn. Las líneas celulares T24 y 253J fueron expuestas a dos dosis de **MV14** y concentraciones crecientes del cisplatino durante 24 y 48 horas.

Los resultados obtenidos nos muestran diferencias entre las líneas celulares T24 y 253J en respuesta al tratamiento combinado. La línea celular 253J responde mejor a la combinación de **MV14** y cisplatino, especialmente en condiciones de mayor tiempo de incubación. El aumento del tiempo de incubación es clave para obtener un mejor efecto sinérgico entre **MV14** y cisplatino en ambas líneas celulares, teniendo un efecto más pronunciado en 253J, donde podemos observar un cambio de un predominante efecto antagonista a un fuerte sinergismo. La concentración más alta de **MV14** (1,56 µM) mostró una mayor capacidad para sensibilizar las células al cisplatino y disminuir la viabilidad celular, así como para inducir un efecto sinérgico en combinación con cisplatino. En base a estos resultados, podemos inferir que la combinación de cisplatino con el compuesto **MV14** sería beneficiosa ya que el compuesto logra sensibilizar las células a cisplatino, logrando reducir la viabilidad utilizando menores concentraciones del quimioterápico de uso convencional.

5.6. Estudios del ciclo celular

En este estudio se evaluó el efecto de **MV14** sobre el ciclo celular de las líneas celulares de cáncer de vejiga T24 y 253J. Los ensayos de ciclo celular son de relevancia en la investigación del cáncer, ya que permiten conocer cómo los compuestos en estudio afectan las diferentes fases del ciclo celular, un proceso crucial para la proliferación y el crecimiento de las células. Para esto, las células fueron tratadas con **MV14** a una concentración de 10 µM durante 3 horas. Se utilizó DMSO al 0,5% como control negativo y, además, se utilizó cisplatino (10 µM) y mitomicina C (10 µM) como referencia para comparar si nuestro compuesto en estudio tenía un comportamiento similar a estos fármacos usualmente empleados en la terapia del cáncer vesical.

En los resultados obtenidos para la línea celular T24 (Figura 20) podemos observar que las células tratadas con DMSO al 0,5% muestran una distribución con un importante porcentaje de células en fase G0/G1, seguido de un porcentaje mayor en la fase S, y un porcentaje menor en la fase G2/M, lo que sugiere que en estas condiciones la mayoría de las células están en la fase de síntesis de ADN (fase S). Para las células tratadas con cisplatino y **MV14** no se obtuvieron cambios significativos, por lo que podemos observar que todos los tratamientos son muy similares al control negativo DMSO. Para las células tratadas con mitomicina C se obtuvo una disminución significativa para la fase G2/M, mientras que la distribución del porcentaje de células en las fases G0/G1 y S permanecen similares al control negativo DMSO. En base a la falta de significancia estadística en los

análisis comparativos podemos inferir que las condiciones experimentales evaluadas en la línea celular T24 no fueron suficientes para generar arresto celular. Por lo tanto, es necesario realizar estudios adicionales con distintas concentraciones y tiempos de incubación para poder confirmar si nuestro compuesto en estudio induce arresto en alguna fase del ciclo celular en la línea celular T24.

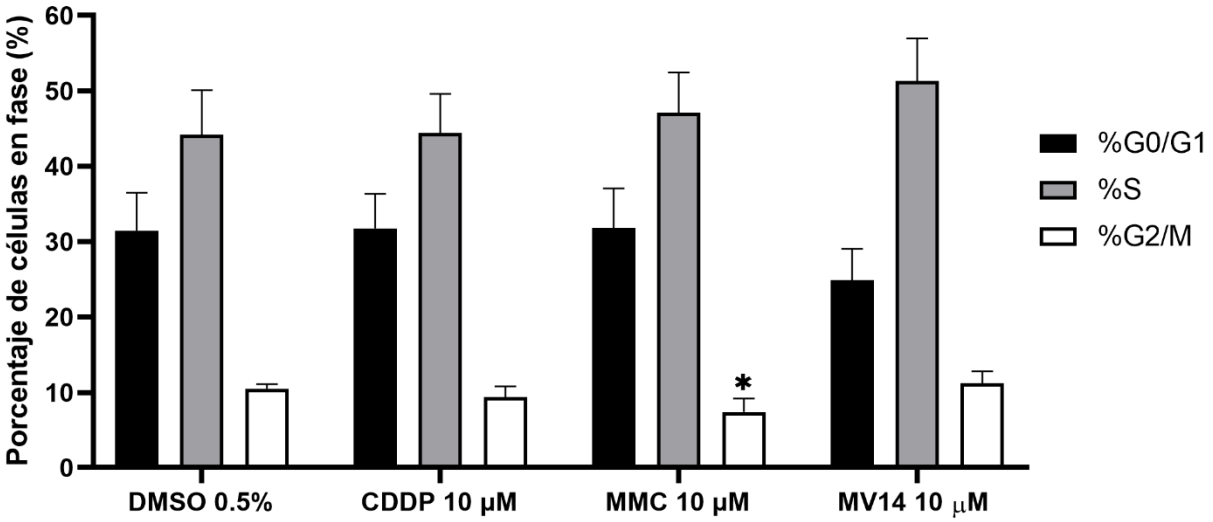

Figura 20 ·. Efecto de cisplatino (CDDP), mitomicina C (MMC) y el compuesto **MV14** sobre el ciclo celular en la línea celular de cáncer de vejiga T24. Los resultados se expresan como el promedio de 3 réplicas ± desvío estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando two-way ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni con * $p = 0.0440$

Los resultados obtenidos para la línea celular 253J (Figura 21) nos muestran cambios significativos en todos los tratamientos. El tratamiento con cisplatino produce un cambio en la distribución de las fases del ciclo celular respecto al control negativo DMSO. Cisplatino muestra una menor porción de la población celular en la fase G0/G1 y un aumento significativo de la población celular en fase S respecto al control negativo, lo que sugiere que está induciendo un bloqueo en esta fase del ciclo celular. Estos resultados nos sugieren que la línea celular 253J, la cual presenta resistencia al cisplatino [68,69,88], podría estar utilizando la acumulación en la fase S como un mecanismo para intentar reparar el daño inducido por este tratamiento. Además, la falta de significancia estadística en la fase G2/M podría reforzar la hipótesis de que las células podrían estar utilizando este bloqueo en fase S para activar vías de reparación del ADN y evitar la apoptosis.

Mitomicina C, muestra una disminución significativa en la fase G0/G1 y presenta un aumento significativo de la población celular en la fase S comparado con el control negativo DMSO. Este resultado sugiere que mitomicina C induce un arresto en la fase S del ciclo celular, lo cual se correlaciona con su mecanismo de acción como agente alquilante, generando entrecruzamientos del ADN, impidiendo la replicación y progresión del ciclo celular durante la síntesis de ADN. Esto también se acompaña de una reducción en el porcentaje de células en la fase G2/M respecto al control negativo DMSO, lo que estaría indicando que pocas células logran avanzar a esta fase después del tratamiento.

Posterior al tratamiento con **MV14,** podemos observar una disminución significativa en la fase G0/G1 y un aumento significativo en la fase S respecto al control negativo DMSO lo que sugiere un arresto en esta fase del ciclo, similar al efecto observado con mitomicina C, además, las células tratadas con **MV14** no muestran cambios significativos en la población en fase G2/M en comparación con el control negativo, siendo similar a lo observado en el tratamiento con cisplatino.

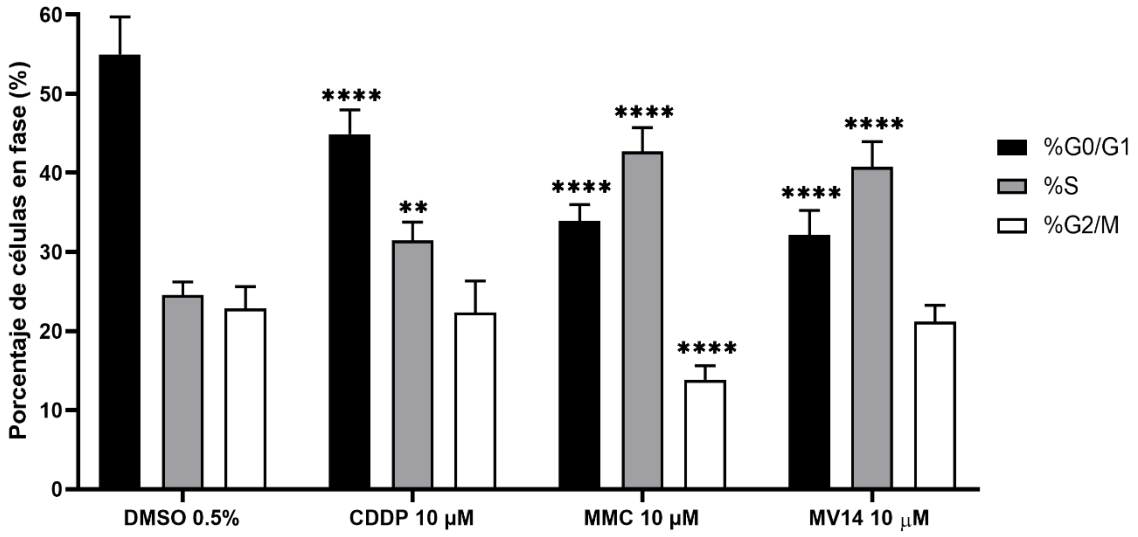

Figura 21. Efecto de cisplatino (CDDP), mitomicina C (MMC) y el compuesto **MV14** sobre el ciclo celular en la línea celular de cáncer de vejiga 253J. Los resultados se expresan como el promedio de 3 réplicas ± desvío estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando two-way ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni con ** $p = 0.0015$ y **** $p < 0.0001$.

En base a los resultados obtenidos, podemos inferir que en la línea celular 253J el compuesto **MV14** muestra un comportamiento prometedor interfiriendo con la progresión normal del ciclo celular, teniendo un comportamiento similar a mitomicina C. Sin embargo, las diferencias en el ciclo celular sugieren que **MV14** podría tener un mecanismo de acción beneficioso en terapias combinadas o como una opción alternativa frente a la resistencia a los tratamientos convencionales. Estos hallazgos sugieren que **MV14** muestra un comportamiento prometedor, siendo beneficioso en terapias combinadas o como una alternativa frente a la resistencia a los tratamientos convencionales. Las diferencias que **MV14** presenta respecto a los fármacos de referencia, por ejemplo, con cisplatino, nos sugieren que una combinación de ambos podría ser beneficiosa ya que las células cancerosas se atacarán en fases distintas de su ciclo celular maximizando la efectividad de la quimioterapia, atrapando y eliminando las células tumorales reduciendo la posibilidad de supervivencia. En general, los resultados obtenidos en estos estudios nos proporcionan una base para seguir explorando más a fondo el mecanismo de acción de nuestro compuesto en estudio.

5.7. Inducción de la apoptosis celular

En primer lugar, se procedió a determinar la concentración del inductor de apoptosis camptotecina (CPT). La camptotecina es un inhibidor de la topoisomerasa I, que induce daño al ADN y apoptosis vía p53 y ciclinas dependientes de quinasas [89]. Las células 253J fueron tratadas con el inductor de apoptosis camptotecina en un rango de concentraciones de 5 a 40 µM y DMSO al 0,5% en medio de cultivo con 2% de SFB durante 24 horas. De acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 22) podemos observar que en el tratamiento con DMSO al 0,5% los porcentajes de células en apoptosis temprana y tardía son bajos, al igual que el porcentaje de células necróticas. Esto nos sugiere que el DMSO al 0,5% tiene un efecto mínimo en la viabilidad celular. Por otro lado, podemos observar que con el tratamiento con camptotecina a las concentraciones más bajas (5 y 10 µM), se presenta un aumento en el porcentaje de células en apoptosis (tanto temprana como tardía). Sin embargo, a las concentraciones más altas (20 y 40 µM), si bien hay inducción de apoptosis, podemos observar que hay un aumento en la necrosis celular, lo que nos estaría indicando un daño más severo que podría estar excediendo las capacidades de las células para iniciar y completar el proceso apoptótico.

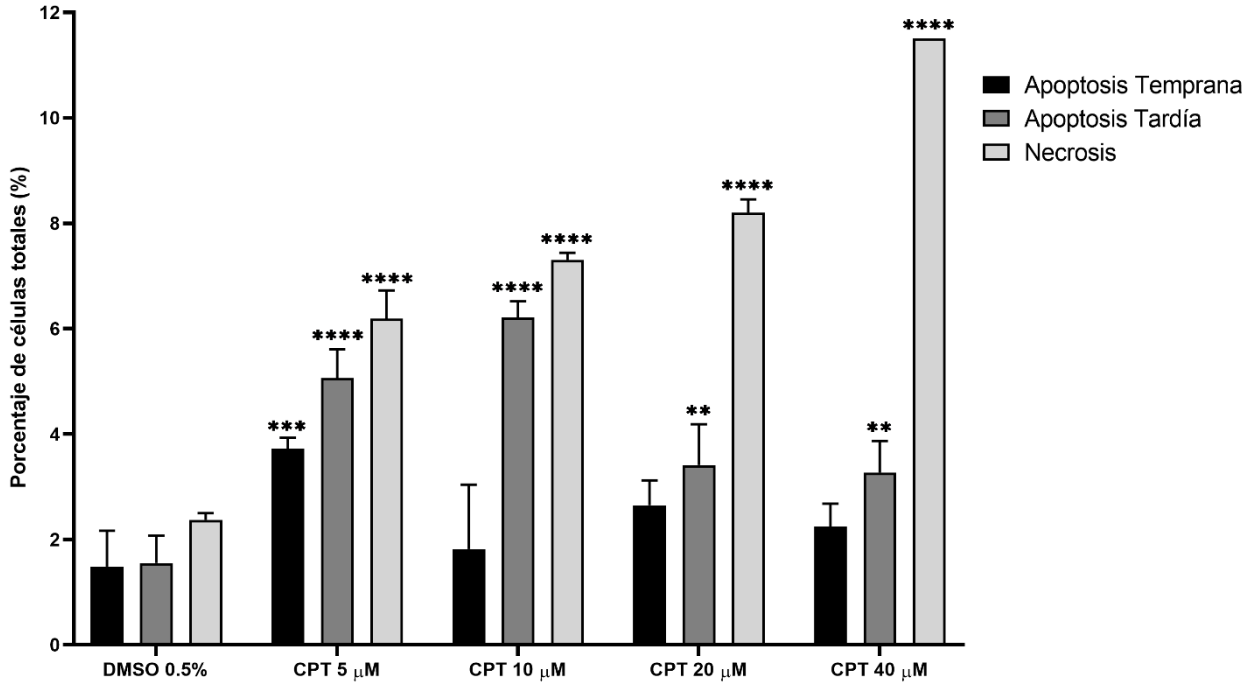

Figura 22. Gráfico de porcentaje de células en apoptosis (temprana y tardía) y necrosis en la línea celular 253J tratada con camptotecina (CPT) a 5, 10, 20 y 40 µM durante 24 horas. Los resultados se expresan como el promedio de 2 réplicas ± desvío estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando two-way ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett con ** $p = 0.0050$ y 0.0016, *** $p = 0.009$, **** $p < 0.0001$.

Los resultados obtenidos anteriormente muestran una clara relación entre la concentración de camptotecina y el tipo de muerte celular inducida. A concentraciones más bajas y moderadas, la camptotecina induce preferentemente apoptosis, lo que la convierte en un buen agente citotóxico para estudios en los que se quiera evaluar la respuesta apoptótica en células cancerosas. Por el contrario, a concentraciones más altas comienza a predominar la necrosis, lo cual puede ser menos deseable en ciertos contextos donde se busca una muerte celular más regulada como la apoptosis, que tiene menos efectos inflamatorios secundarios.

Para continuar con estos estudios, decidimos avanzar utilizando la concentración más alta de camptotecina (40 µM). Esto debido a que los porcentajes de células que sufren muerte (ya sea por apoptosis o necrosis) son demasiado bajos y buscamos tener un control positivo robusto, con una señal clara y fuerte de muerte celular, por lo que los porcentajes obtenidos a la concentración más alta de camptotecina nos proporcionan un mayor efecto citotóxico. Además, emplear una dosis elevada como control positivo permite evaluar

tanto la eficacia como la aparición de necrosis, lo cual es esencial para determinar los perfiles de seguridad y los mecanismos de acción de otros tratamientos evaluados en paralelo.

Las células 253J fueron tratadas con **MV14** a una concentración de 5 y 10 µM, camptotecina (40 µM) y DMSO al 0,5% durante 24 horas. En los resultados obtenidos (Figura 23) podemos observar que el tratamiento con DMSO al 0,5% no indujo daño en las células, lo que valida su uso como control negativo. Los bajos porcentajes de células en apoptosis temprana y tardía nos sugiere que el DMSO en el porcentaje utilizado para estos ensayos no tiene efectos tóxicos o proapoptóticos sobre la línea celular 253J. Por otro lado, la camptotecina mostró un aumento significativo en la inducción de apoptosis tardía, presentando un aumento más prominente en la necrosis, siendo consistente con los resultados obtenidos anteriormente. Para el tratamiento con **MV14** podemos observar que en las dos concentraciones evaluadas tenemos un aumento significativo en la inducción de apoptosis. El tratamiento con **MV14** a 5 µM indujo tanto apoptosis temprana como tardía, presentando un incremento significativo en ambas fases en comparación con el control negativo DMSO. Sin embargo, la apoptosis tardía fue la más prominente, lo que nos indica un progreso significativo de las células hacia etapas más avanzadas de apoptosis tras el tratamiento. Para **MV14** a 10 µM, podemos observar que a esta concentración el compuesto mostró un efecto aún más marcado, con un porcentaje aún mayor de células en apoptosis tardía, superando significativamente al efecto observado con **MV14** a 5 µM y el control positivo camptotecina. La inducción de apoptosis tardía en un porcentaje tan alto sugiere que **MV14** tiene un potente efecto proapoptótico, siendo superior a la camptotecina bajo las condiciones experimentales evaluadas.

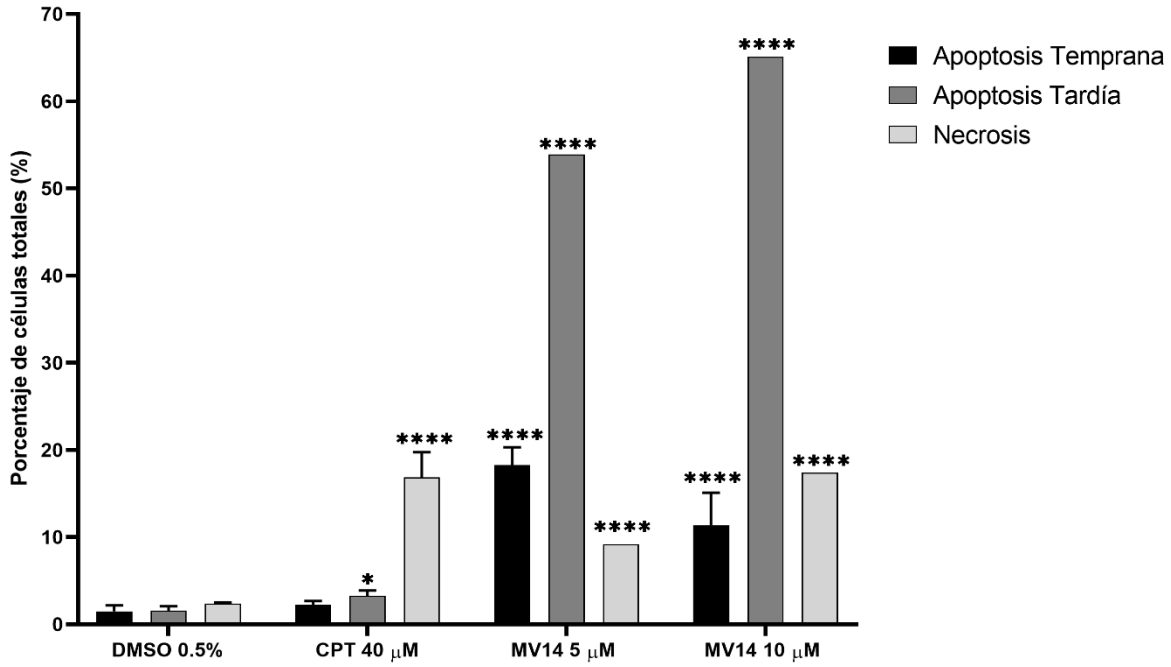

Figura 23. Gráficos del porcentaje de apoptosis (temprana y tardía) y necrosis en la línea celular 253J tratada con camptotecina (CPT) 40 µM y **MV14** a (5 y 10 µM) durante 24 horas. Los resultados se expresan como el promedio de 2 réplicas ± desvío estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando two-way ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett con * $p = 0.0453$, **** $p < 0{,}0001$.

El perfil de apoptosis observado con **MV14** sugiere que el compuesto es altamente efectivo para inducir la muerte celular programada en la línea celular 253J. El alto porcentaje de células en apoptosis tardía sugiere que **MV14** puede estar induciendo daño en el ADN u otro tipo de estrés celular que llevan a un rápido progreso hacia la apoptosis. La diferencia en la distribución entre apoptosis temprana y tardía al comparar ambas concentraciones de **MV14,** nos sugiere que a dosis más altas el compuesto induce un efecto más rápido y más profundo en la célula.

En general, los resultados preliminares obtenidos en la línea celular 253J, nos indican que el compuesto **MV14** muestra una alta eficacia en la inducción de apoptosis, tanto en su fase temprana como tardía, siendo más potente que el control positivo camptotecina. Así mismo, estos resultados nos sugieren que, **MV14** podría estar promoviendo tanto apoptosis como necrosis (en porcentajes más bajos), dependiendo de la concentración, lo que podría ser beneficioso para eliminar células tumorales que pueden ser resistentes a un solo tipo de muerte celular. Sin embargo, para confirmar los resultados obtenidos, es necesario realizar más estudios en líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga,

considerando cuidadosamente las concentraciones y condiciones óptimas a evaluar para maximizar la inducción de apoptosis y minimizar la necrosis, con el fin de asegurar un efecto seguro y eficaz.

5.8. Determinación del efecto genotóxico

5.8.1. Inmunocitoquímica γH2AX

Se determinó el efecto genotóxico de **MV14** sobre células T24 y 253J mediante la cuantificación de los niveles de γ-H2AX a través de ensayos de inmunocitoquímica. Asimismo, se determinó el rol del ·NO liberado por **MV14** en la generación del daño al ADN a través de la pre-incubación del cultivo con hemoglobina y posterior tratamiento con **MV14** (5 y 10 µM). Los resultados indican que **MV14** genera rupturas de doble cadena en el ADN de las células cancerígenas (Figura 24).

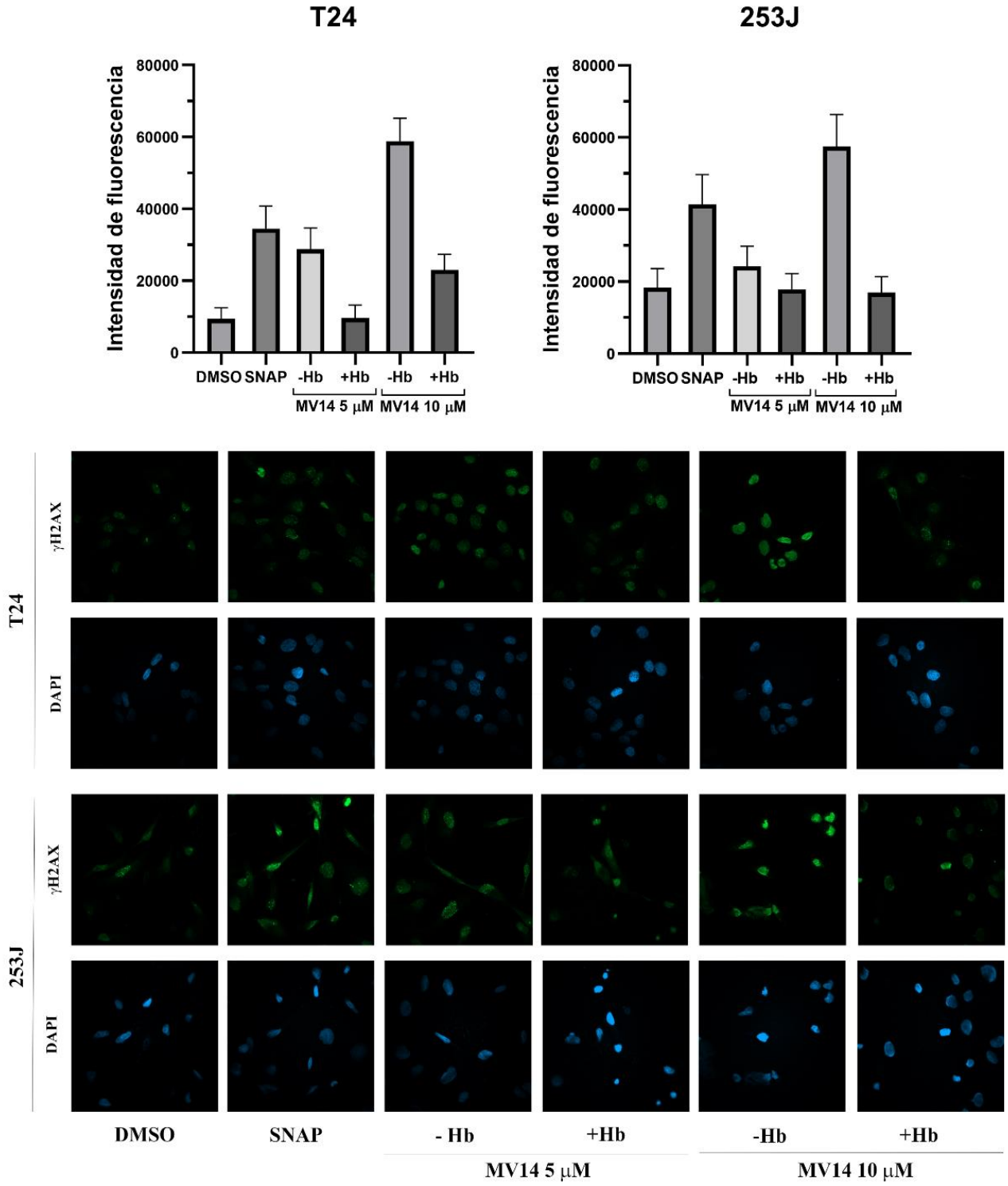

Figura 24. Intensidad de fluorescencia de γ-H2AX en células T24 y 253J tratadas con **MV14** en ausencia y presencia de hemoglobina (Hb). Control negativo DMSO 0,5% y control positivo SNAP 50 µM. Los resultados se expresan como el promedio ± desvío estándar.

En la línea celular T24, podemos observar un aumento en la intensidad de fluorescencia con el tratamiento de **MV14** en las dos concentraciones evaluadas. Para **MV14** a 5 µM, en ausencia de hemoglobina, observamos un aumento en la intensidad de fluorescencia siendo superior respecto al control negativo, indicando daño genotóxico. En presencia de hemoglobina, la intensidad de fluorescencia permanece muy similar a los niveles de nuestro control negativo, lo que nos estaría indicando una nula inducción de daño. Para **MV14** a 10 µM, en ausencia de hemoglobina, observamos un aumento en la intensidad de fluorescencia, siendo muy superior a la intensidad a 5 µM y la del control positivo SNAP, lo cual nos indica un incremento en el daño genotóxico con la dosis más alta de **MV14**. En presencia de hemoglobina, la intensidad de fluorescencia fue superior a la de nuestro control negativo, lo que nos estaría indicando una posible inducción de daño por parte de **MV14** independiente de la liberación de ·NO.

En la línea celular 253J, los resultados fueron similares a los obtenidos en T24. En ausencia de hemoglobina, observamos un aumento en la intensidad de fluorescencia en las dos concentraciones de **MV14**, siendo ambas muy superiores al control negativo. Solamente la dosis más alta de **MV14**, presentó una intensidad superior a la del control positivo SNAP. En presencia de hemoglobina, la fluorescencia fue muy similar a la del control negativo, lo que nos estaría indicando que la presencia de hemoglobina nos estaría mitigando el daño genotóxico inducido por parte de **MV14**.

En base a estos resultados, podemos inferir que el compuesto **MV14** induce daño genotóxico de manera dosis-dependiente en las células derivadas de cáncer de vejiga. Así mismo, podemos inferir que el ·NO liberado por la molécula podría estar involucrado en la generación del daño genotóxico.

5.8.2. Ensayo Cometa

Adicionalmente, el efecto genotóxico de **MV14** fue determinado mediante ensayo cometa alcalino. En este método, los cometas fueron clasificados en una de las cinco clases según la longitud de la cola y se les dio un valor de 0 (sin daño) a 4 (daño máximo). Los resultados presentados en la Figura 25 nos muestran que el compuesto **MV14** induce daño al ADN de las células de cáncer vesical, siendo el grado de daño muy similar al inducido por H_2O_2.

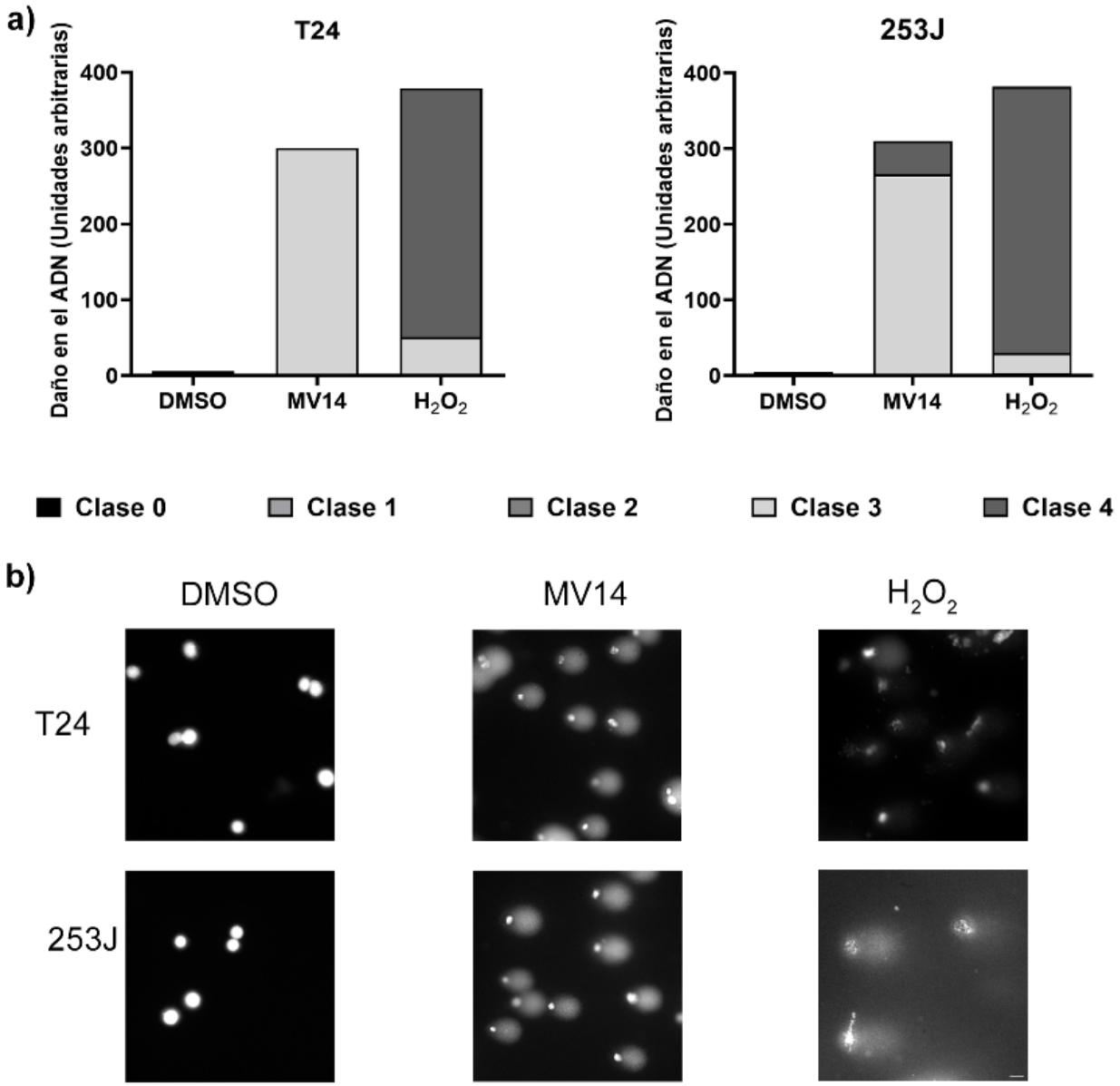

Figura 25. Ensayo Cometa alcalino de células T24 y 253J tratadas con el compuesto **MV14** a una concentración de 50 µM. Control negativo DMSO 0,5% y control positivo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 100 µM.

En ambas líneas celulares, podemos observar que **MV14** muestra un aumento significativo de daño al ADN respecto al control negativo, siendo menos severo que el inducido por el control positivo H_2O_2. La línea celular 253J parece ser ligeramente más susceptible al daño generado por **MV14** comparada con T24, aunque ambas muestran un patrón similar de incremento en el daño generado.

En base a estos resultados, podemos observar que el compuesto **MV14** induce daño en el ADN celular cuando se utiliza una concentración de 50 μM. El daño es considerable, pero es menos severo que el inducido por el peróxido de hidrógeno en ambas líneas celulares.

5.9. Ensayos de migración celular

El estudio de migración celular es una técnica que permite estudiar la capacidad migratoria de las células cancerosas y, eventualmente, invadir otros tejidos, un paso crítico en el proceso de metástasis. En base a esto, como primera aproximación se determinó la capacidad de **MV14** de inhibir la migración celular a través del ensayo de herida. Para esto, las células se incubaron durante 17 horas en presencia de **MV14** a una concentración de 5 y 10 μM. Se incluyó SAHA a 10 μM como control positivo y DMSO al 0,5% como control negativo. Los resultados indican (Figura 26) que **MV14** en ambas líneas celulares a las dos concentraciones evaluadas tiene un efecto inhibidor en la migración. Observamos que, en ambas líneas celulares, el compuesto **MV14** a una concentración de 5 μM reduce la migración celular de manera significativa. Sin embargo, podemos observar que la línea T24 es levemente más sensible al compuesto a esta concentración, respecto a la línea 253J. También, para **MV14** a 10 μM observamos que ambas líneas celulares muestran una mayor inhibición de la migración celular, significativamente mayor que la del compuesto SAHA.

En base a estos resultados, podemos inferir que el compuesto **MV14** muestra una clara inhibición de la migración celular en las líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga. El compuesto presenta una significativa relación dosis-respuesta, ya que a una mayor concentración de **MV14** mayor es la inhibición de la migración celular. Esto nos sugiere que **MV14** es efectivo en inhibir la migración celular, con una eficacia mayor a concentraciones altas.

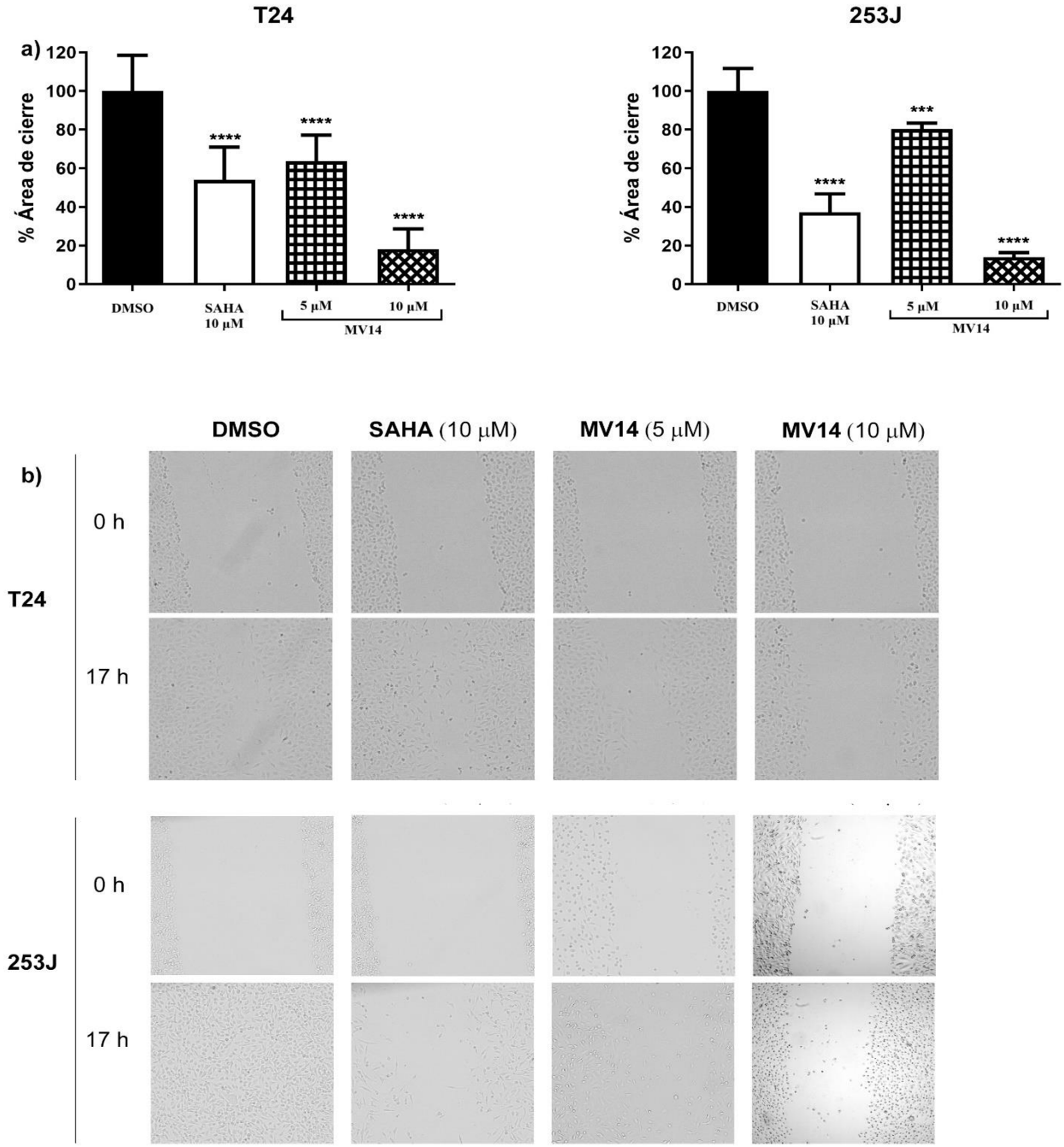

Figura 26. Efecto del compuesto **MV14** sobre la migración celular en las líneas celulares T24 y 253J. a) Porcentaje de área de cierre de herida en presencia de **MV14** a 5 y 10 µM durante un periodo de 17 horas de incubación. Se incluyó SAHA a 10 µM como control positivo. El gráfico representa el promedio ± SD. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando one-way ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett con *** $p = 0.0005$, **** $p < 0{,}0001$. b) Imágenes representativas a las 0 y 17 horas para ambas líneas celulares del ensayo de herida para cada condición experimental mostrada en a).

5.10. Estudios de la expresión de survivina

Previamente, en nuestro grupo de investigación se evidenció la capacidad del compuesto **MV14** de inhibir la vía NF-kB la cual promueve la expresión de la proteína survivina. La survivina juega un papel muy importante en la proliferación de las células cancerosas y en la inhibición de la apoptosis celular. Además, la sobreexpresión de survivina está asociada con una etapa avanzada del cáncer, mal pronóstico y disminución de la respuesta al tratamiento. Para determinar si el compuesto **MV14** es capaz de inhibir la expresión de survivina se realizaron ensayos de western blot. Las células T24 y 253J fueron tratadas con **MV14** a 5 y 10 µM durante 24 horas. Se incluyó el compuesto baicaleina a 20 µM como control positivo y DMSO al 0,5% como control negativo. Los resultados obtenidos (Figura 27) muestran que **MV14** inhibe significativamente la expresión de survivina en ambas líneas celulares. En la línea celular T24, observamos que la inhibición es dependiente de la dosis, mostrando una mayor inhibición en la expresión de survivina al aumentar la concentración del compuesto. En la línea celular 253J, observamos que presenta una inhibición total de la expresión de survivina, con lo cual se podría inferir que esta línea celular podría ser más sensible al tratamiento con **MV14** comparado con la línea celular T24.

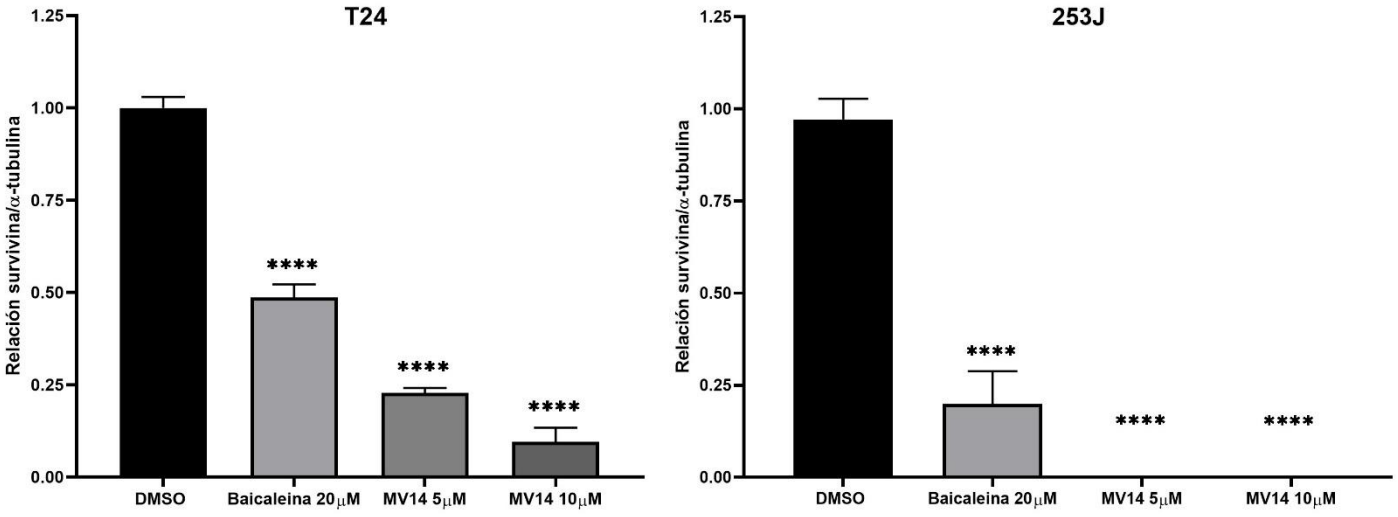

Figura 27. Relación survivina/α-tubulina del análisis western blot en las líneas celulares T24 y 253J tratadas con el compuesto **MV14**. El gráfico presenta la media ± desviación estándar de 5 ensayos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett con **** $p <$ 0,0001.

La inhibición en la expresión de survivina observada en estos ensayos constituye un hallazgo relevante en el contexto de las terapias dirigidas contra el cáncer de vejiga, particularmente por el papel crítico que esta proteína juega en la supervivencia celular y la resistencia a los tratamientos. La significativa reducción en la expresión de survivina, especialmente en la línea celular 253J, sugiere que **MV14** podría tener un efecto citotóxico diferencial entre distintos tipos de células cancerosas, lo que podría ser una opción prometedora para tumores más agresivos o resistentes a la quimioterapia.

La disminución de survivina después del tratamiento con **MV14** se asocia, de manera predecible, con un aumento en la susceptibilidad a la apoptosis. Esto es congruente con el mecanismo citotóxico de varios agentes antitumorales que inducen la muerte celular al desactivar vías de supervivencia. La survivina actúa como un inhibidor clave de las caspasas, y su inhibición por parte de **MV14** nos sugiere que las células cancerosas tratadas con el compuesto pueden estar sufriendo arresto en el ciclo celular, lo que impide su proliferación, lo que es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos realizados de ciclo celular. El hecho de que en la línea celular 253J muestra una inhibición total de survivina refuerza la idea de que **MV14** podría ser especialmente efectivo en ciertos subtipos de cáncer de vejiga, donde la apoptosis es más fácilmente inducible.

Por otro lado, el efecto observado en la línea celular T24, destaca la importancia de la concentración de **MV14** en la eficacia terapéutica. A medida que aumenta la dosis de **MV14**, no solo se inhibe más significativamente la survivina, sino que esto podría reflejar un bloqueo más eficaz del ciclo celular en etapas clave de la división celular, limitando la expansión del tumor. La disminución de la expresión de survivina podría también estar facilitando el daño al ADN, al dejar a las células cancerosas sin una de sus principales defensas contra el estrés genotóxico. Esto sugiere que **MV14** no solo inhibe la proliferación, sino que también podría potenciar los efectos de otros tratamientos que generan estrés oxidativo o daño en el ADN, como la radioterapia o ciertos agentes quimioterapéuticos.

Adicionalmente, la relación entre la survivina y los procesos de migración e invasión celular es otro aspecto relevante que debe considerarse. La inhibición de la survivina por parte de **MV14** puede estar impactando la capacidad de las células cancerosas para migrar y formar metástasis. Esto es de suma importancia en el tratamiento de cánceres avanzados, donde la diseminación metastásica es el principal desafío terapéutico. Por lo tanto, el efecto anti-migratorio de **MV14** podría representar un valor añadido en su acción

anticancerígena, ya que reduciría no solo el crecimiento tumoral primario, sino también la propagación a sitios distantes.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio nos sugieren que la inhibición de la expresión de survivina mediante **MV14** no solo está contribuyendo a la citotoxicidad y al arresto del ciclo celular, sino que también podría estar incrementando la vulnerabilidad de las células cancerosas a otros tipos de daño y reduciendo su capacidad para invadir nuevos tejidos. Esto posiciona al compuesto **MV14** como un candidato prometedor en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, particularmente en el tratamiento de cánceres de vejiga resistentes y agresivos.

5.11. Determinación del efecto mutagénico

El efecto mutagénico de **MV14** fue determinado mediante el test de AMES empleando las cepas de *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 y *E. coli* WP2 uvrA (pKM101). En primer lugar, se determinó la toxicidad de **MV14** en un rango de concentraciones de 0,01-100 µg/placa donde no se observó toxicidad en ninguna cepa bacteriana. Posteriormente, se evaluó la mutagenicidad del compuesto en un rango de concentraciones de 1-100 µg/placa para cada una de las cepas. Se utilizó DMSO como control negativo, y como control positivo se utilizaron agentes mutagénicos específicos para cada cepa (Tabla 6).

Los resultados obtenidos, de acuerdo con los criterios establecidos según las referencias [80], indican que el compuesto **MV14** no muestra evidencia de ser mutagénico en ninguna cepa bacteriana utilizada en estos estudios. Los valores de colonias revertientes permanecen bajos y muy similares al control negativo DMSO en todas las concentraciones probadas, sin acercarse a los valores elevados observados en los controles positivos específicos para cepa. Estos resultados sugieren que **MV14** en el contexto del ensayo bacteriano de AMES es un compuesto no mutagénico.

Número de colonias promedio				
Dosis (µg/placa)	***S. typhimurium* TA97a**	***S. typhimurium* TA98**	***S. typhimurium* TA100**	***E. coli* WP2 uvrA (pKM101)**
100	7	9	56	106
33	7	14	39	94
11	10	16	53	93
3	8	16	42	98
1	8	11	74	154
Control DMSO (-)	8	12	60	90
Control (+) *	57	285	1592	266
	*** 9-Aminoacridina**	***2-Nitrofluoreno**	***Azida de sodio**	***4-nitroquinolina 1-oxido**

Tabla 6. Número de colonias promedio revertientes para cada una de las cepas en el estudio del compuesto **MV14**.

5.12. Actividad antitumoral *in vivo*

5.12.1. Desarrollo del modelo de cáncer de vejiga murino y tratamiento intravesical con el compuesto MV14.

El desarrollo de un modelo murino es clínicamente relevante ya que proporcionan un medio para la investigación del desarrollo y progresión del cáncer de vejiga, la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico de la patología y el estudio traslacional de nuevas terapias, lo que permite una exploración más exhaustiva de los hallazgos determinados *in vitro* antes de los ensayos clínicos.

El cáncer de vejiga fue inducido en ratones hembra C57BL/6 mediante la administración del compuesto BBN en el agua de bebida *ad libitum* durante 16 semanas. Se realizó un seguimiento en el consumo de agua para asegurarnos que los animales consumieran el carcinógeno y que mantuvieran una ingesta de agua adecuada. En los resultados mostrados en la Figura 28 podemos observar que la ingesta de agua por parte de ambos grupos fue bastante similar, lo que nos sugiere que los animales tuvieron una administración constante del carcinógeno.

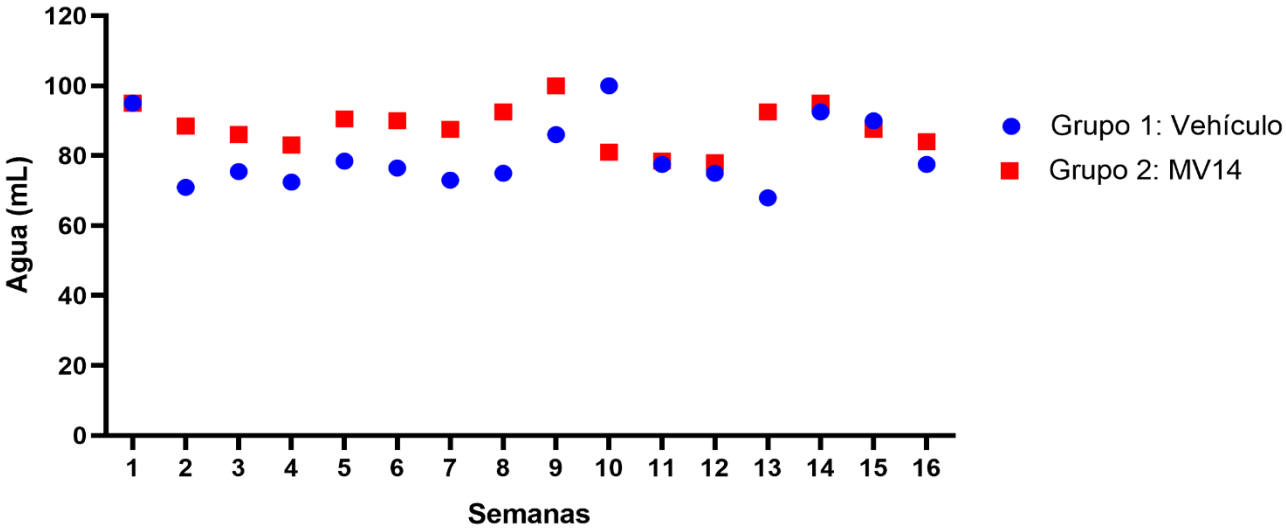

Figura 28. Registro de la ingesta de agua con BBN durante 16 semanas consecutivas.

Una vez finalizada la inducción del cáncer en la semana 16, se suspendió el consumo del carcinógeno y los animales comenzaron a beber agua libre de BBN. A partir de la semana 17 se realizó el tratamiento intravesical una vez por semana durante cuatro semanas consecutivas. Antes de cada instilación se recolectó la orina de todos los animales mediante masaje vesical (Figura 29) y fue almacenada a -80ºC para su posterior estudio.

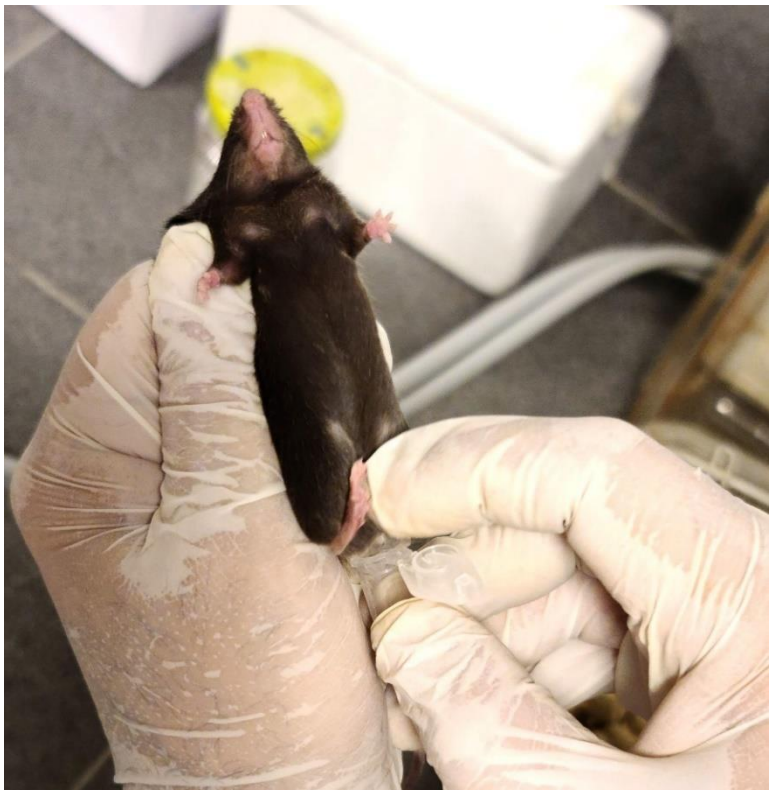

Figura 29. Recolección de orina mediante masaje vesical en ratones hembra C57BL/6.

La instilación intravesical (Figura 30) se realizó de manera exitosa en todos los animales, lo que fue un logro significativo dado que cualquier complicación en esta etapa podría haber sido comprometedora para el animal. La selección de un catéter de teflón de calibre 24 permitió la administración precisa de las soluciones en la vejiga y también minimizó el riesgo de daño a los tejidos, lo que fue fundamental para mantener la integridad del estudio. La administración de las soluciones se realizó bajo anestesia con isofluorano al 3%, lo que garantizó que los animales permanecieran inmóviles durante todo el procedimiento, reduciendo el estrés y el dolor que podrían haber afectado los resultados.

Figura 30. Instilación intravesical mediante catéter de teflón calibre 24.

Aunque algunos animales presentaron un leve sangrado después de la inserción del catéter, esta complicación es un efecto adverso menor dentro de los procedimientos de instilación intravesical. La ausencia de complicaciones graves a lo largo de las cuatro semanas de tratamiento nos sugiere que hubo buena tolerancia al procedimiento empleado y a los tratamientos realizados en este modelo experimental, siendo este un aspecto

crucial, ya que la cualquier toxicidad local podría haber influido negativamente en los resultados.

Cada tratamiento tuvo una duración de 60 minutos, durante este tiempo, los animales se mantuvieron bajo anestesia con un rango de isofluorano entre 1-2% (Figura 31), esto fue para mantener a los animales en un estado de anestesia ligera pero estable, permitiendo que el tratamiento se realizara sin interrupciones. Para evitar que el compuesto se saliera de la vejiga y pudiera interactuar eficazmente con el epitelio vesical, los animales permanecieron cateterizados y se incluyó la técnica de rotación de los animales cada 15 minutos en un ángulo de 90º, lo que permitió maximizar el contacto de **MV14** con toda la superficie de la vejiga. La homogeneidad en la distribución del compuesto, podría ser un factor determinante en la evaluación del efecto terapéutico de **MV14**, ya que cualquier desigualdad en la exposición podría llevar a resultados inconsistentes.

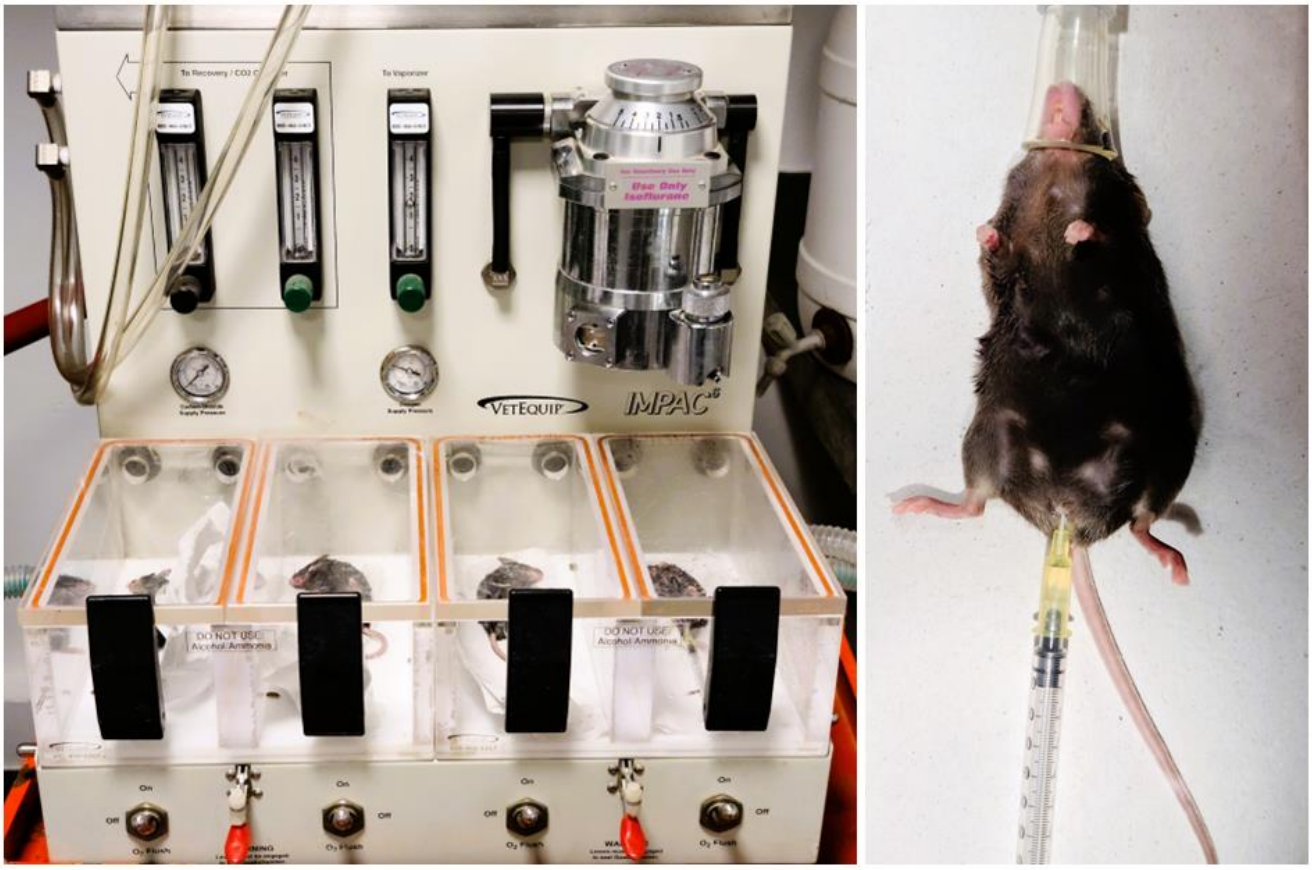

Figura 31. Animales bajo anestesia con isoflurano en el tratamiento intravesical.

Tras el tratamiento, se observó que los animales continuaron su desarrollo sin signos evidentes de estrés severo o alteraciones en su comportamiento, lo que nos sugiere que **MV14**, en la dosis administrada, es bien tolerada en el contexto de un tratamiento

repetido. Además, la administración de **MV14** sin la aparición de complicaciones graves, nos impulsa a seguir con la evaluación de la eficacia antitumoral de nuestro compuesto en estudio. En resumen, el protocolo de desarrollo de un modelo murino de cáncer de vejiga y la administración intravesical de **MV14** fue implementado con éxito.

5.12.2. Estudios de imagen por Resonancia Magnética (MRI)

Los estudios de imagen por resonancia magnética (MRI) son una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico y en la investigación preclínica de nuevos tratamientos oncológicos. Este tipo de cáncer es conocido por su recurrencia, heterogeneidad y su capacidad para infiltrarse en los tejidos circundantes, lo que complica su tratamiento y manejo. En este sentido, uno de los principales beneficios de la MRI es su capacidad para proporcionar imágenes de alta resolución sin la necesidad de radiación ionizante, lo que la convierte en una técnica no invasiva y segura. La importancia de la MRI en estudios de cáncer de vejiga radica en su capacidad para proporcionar una visualización detallada de la estructura interna del tumor y su entorno, a diferencia de otras técnicas de imagen, la MRI permite la evaluación no invasiva del volumen tumoral y la posible infiltración en órganos vecinos. La información brindada por esta técnica es de gran importancia para comprender la progresión de la enfermedad y los efectos de los tratamientos a nivel tisular.

Se realizó la adquisición de imágenes pre y postratamiento por MRI. Para esto, los animales fueron previamente anestesiados con isofluorano al 4% y colocados en posición prona sobre la plataforma del escáner (Figura 32A). La adquisición se realizó en el equipo nanoScan PET/MRI3T(Mediso®) (Figura 32B), tuvo una duración de 30:17 minutos por animal y se obtuvieron un total de 94 *slices* por cada animal, durante este tiempo los animales permanecieron bajo anestesia con isofluorano al 2% para minimizar el movimiento y reducir el estrés.

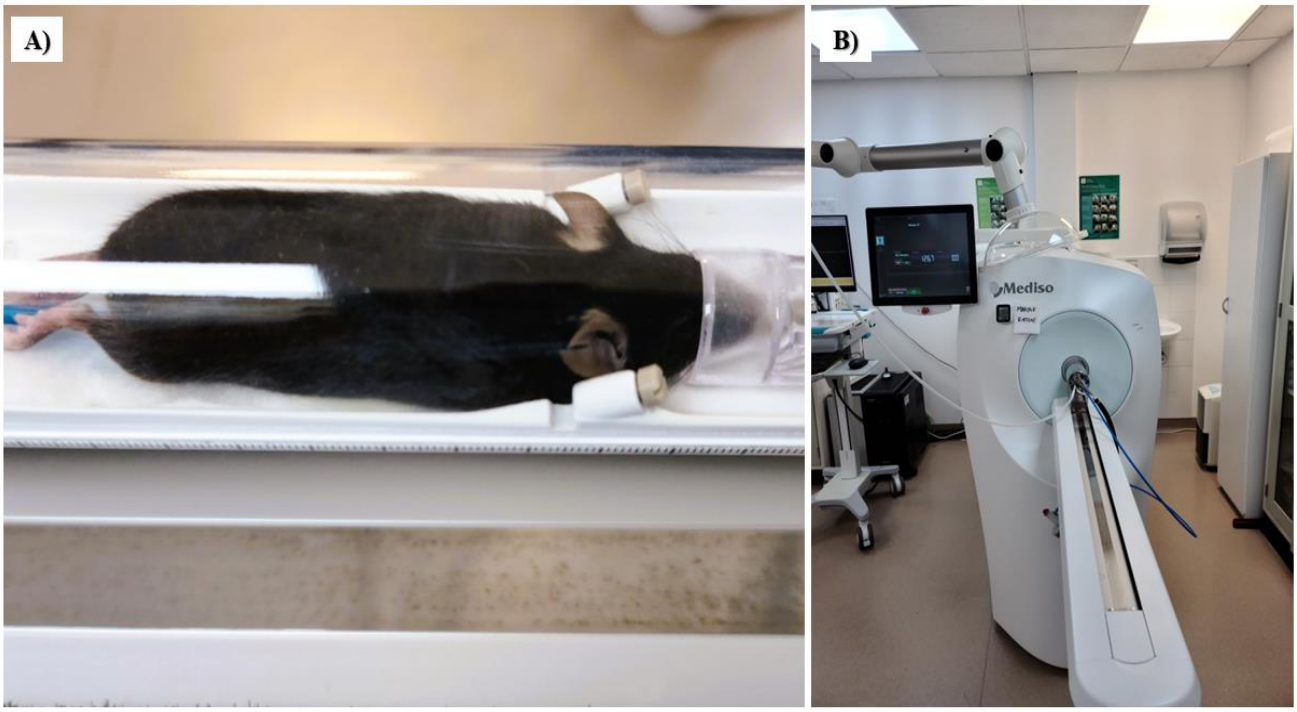

Figura 32. A) Ratón hembra C57BL/6 anestesiado y colocado en posición prona previo a la entrada al equipo de resonancia magnética. **B)** Equipo de resonancia magnética nanoScan PET/MRI3T(Mediso®).

En este estudio, se realizó un análisis volumétrico de las imágenes pre y postratamiento (Figura 33) del grupo control con BBN y del grupo tratado con **MV14**. En este método de análisis se mide el volumen total del tumor, permitiendo evaluar la evolución del tumor en respuesta a un tratamiento. En el análisis realizado, se encontró que la presencia del tumor en la vejiga de los animales tanto los tratados con vehículo como con el compuesto **MV14** era demasiado extensa. Este crecimiento tumoral excesivo dificultó la capacidad de delimitar con precisión la pared y la identificación de la luz intravesical. La identificación de estos límites es fundamental para un análisis volumétrico preciso, ya que esto permite diferenciar entre el tejido tumoral y el tejido sano, lo que a su vez posibilita la cuantificación del volumen tumoral y la evaluación de la eficacia del tratamiento. Sin embargo, en nuestro caso la infiltración tumoral era tan extensa que el tumor ocupaba prácticamente toda la cavidad vesical, lo que fue un impedimento para una clara demarcación de las fronteras anatómicas necesarias. Debido a esta situación, no fue posible obtener diferencias significativas en los volúmenes pre y postratamiento utilizando este método de análisis.

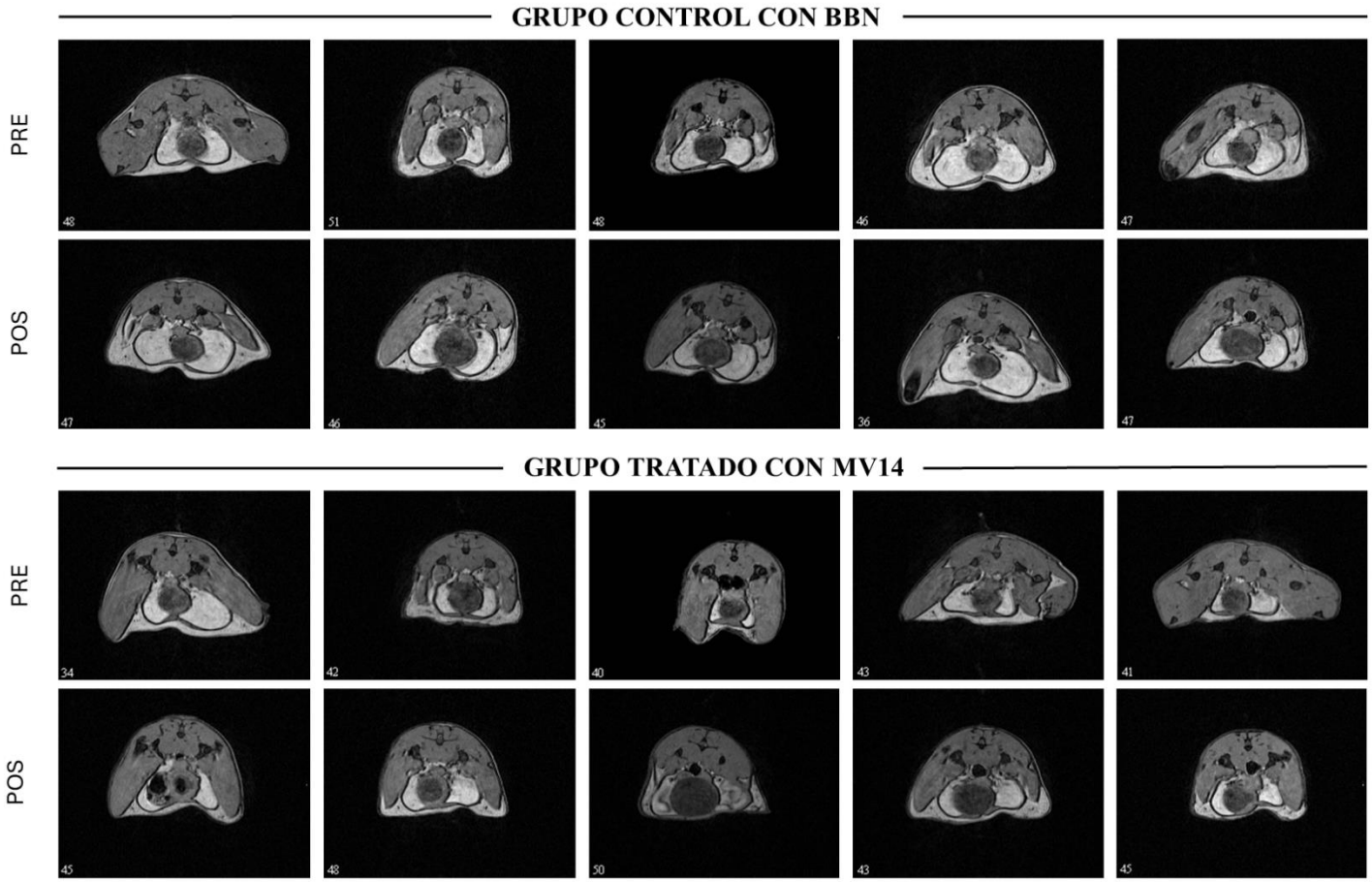

Figura 33. Imágenes de MRI comparativas pre y postratamiento del grupo control con BBN y el grupo tratado con el compuesto **MV14**.

Debido a la situación presentada anteriormente, se decidió analizar la imagenología mediante la incorporación de una región de interés volumétrica (VOI) restringida al tamaño de la vejiga de cada animal. La cuantificación de la diferencia entre la señal del líquido (orina) vs. tejido tumoral se realizó mediante la umbralización del histograma de los *voxels* que se encuentran dentro de esta VOI, considerando que para valores menores a 40 se trata de una señal de líquido mientras que para valores dentro del rango 70-170 (medidos empíricamente) se puede considerar señal de tejido o tumor. Dado el origen de la señal de resonancia se consideró solo la cuantificación del volumen. Como mecanismo de normalización entre animales se cuantificó la cantidad de *voxels* dentro de la región de tumor dividido el total entre tumor y líquido.

A partir de las mediciones de volumen de tumor/líquido, se cuantificó el valor normalizado T/(T+N) para cada animal. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Condición	**Ratón**	**Npre**	**Tpre**	**T/(T+N)pre**	**Npos**	**Tpos**	**T/(T+N)pos**
Grupo control con cáncer de vejiga tratado con vehículo	C1R1	80	5313	**0,985**	96	4705	**0,980**
	C1R2	617	4617	**0,882**	929	10193	**0,916**
	C1R3	158	6968	**0,978**	304	8169	**0,964**
	C1R4	80	6216	**0,987**	195	5188	**0,964**
	C1R5	69	3668	**0,982**	364	13826	**0,974**
Grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14**	C2R1	50	4640	**0,989**	360	4170	**0,921**
	C2R2	416	5797	**0,933**	127	6553	**0,981**
	C2R3	48	3169	**0,985**	32	465	**0,936**
	C2R4	49	2871	**0,983**	276	11065	**0,976**
	C2R5	37	2898	**0,987**	9	211	**0,959**

Tabla 7. Valores normalizados (T/(T+N)) por animal correspondientes al grupo tratado con vehículo y al grupo tratado con **MV14**.

A partir de estos valores, se calculó la media y el desvío para la condición pretratamiento (todos los animales) y postratamiento (grupo control con cáncer de vejiga tratado con vehículo y grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14**). Los valores agrupados se muestran en la Tabla 8.

Condición		**Promedio**	**Desvío**
Pre		**0,969**	0,035
Post	Control Vehículo	**0,960**	0,025
	Tratamiento **MV14**	**0,954**	0,026

Tabla 8. Resultado del cálculo de la media y el desvío de los valores normalizados (pre y postratamiento) para ambos grupos con cáncer de vejiga.

Debido a que este fue un estudio preliminar con un número reducido de animales, la progresión del cáncer de vejiga fue demasiado extensa por lo que no se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con vehículo vs. el grupo tratado con **MV14**. Es importante señalar que esta falta de diferencia tampoco se puede apreciar cualitativamente en las imágenes obtenidas, independientemente del método empleado para cuantificar los volúmenes tumorales.

En base a los resultados obtenidos de estos estudios podemos destacar que evidenciamos la presencia de tejido tumoral en todos los animales expuestos al carcinógeno BBN, lo que sugiere que el modelo murino de cáncer de vejiga fue desarrollado satisfactoriamente. Además estos resultados, aunque poco favorables no son desalentadores, ya que pudimos notar que en estas condiciones de estudio el avance tumoral del modelo complicó la cuantificación y no se pudo observar diferencias entre los grupos (grupo tratado con vehículo y grupo tratado con **MV14**), lo que nos abre camino para estudios futuros donde podamos aumentar el número de animales y realizar un seguimiento por MRI con una

mayor frecuencia , lo que permitirá evaluar de manera más precisa tanto el desarrollo del cáncer de vejiga como la eficacia de las distintas condiciones de tratamiento a realizar.

5.12.3. Análisis de Orina

El análisis de orina es una técnica fundamental en la práctica clínica, que ofrece una visión detallada del estado fisiológico y patológico del sistema urinario. Es un método no invasivo que permite la evaluación de múltiples parámetros, desde la presencia de elementos celulares y cristales hasta el pH, que es un indicador clave del equilibrio ácido-base del organismo.

En el contexto del estudio del cáncer, el análisis de orina adquiere una relevancia adicional. La determinación del pH urinario es importante para entender el microambiente tumoral y su impacto en la progresión del cáncer, así como la efectividad de ciertos tratamientos farmacológicos. Un pH alterado puede indicar desequilibrios metabólicos o infecciones, ambos factores pueden influir en la respuesta al tratamiento. Por otro lado, el análisis de sedimento urinario incluye la observación de elementos celulares y no celulares bajo el microscopio, proporciona información crucial sobre la presencia de células tumorales, hematuria, inflamación y otros indicadores de daño o disfunción en el tracto urinario. Estos estudios son particularmente relevantes en la investigación de nuevas moléculas bioactivas para el tratamiento del cáncer de vejiga, ya que permiten la visualización directa del impacto de estas moléculas en la salud del epitelio urotelial y en la dinámica celular del tumor. Además, el uso de técnicas de tinción como Giemsa en los extendidos de orina ofrece una visualización más nítida y detallada de estructuras celulares, permitiendo la diferenciación entre células benignas y malignas.

En primer lugar, se registró el pH de la orina utilizando tira reactiva. La orina de los animales del grupo control (sin cáncer de vejiga) presentó valores de pH de 6.0, mientras que la orina de los grupos con cáncer de vejiga (grupo tratado con vehículo y grupo tratado con **MV14**) presentó valores de pH que oscilaron entre 7.0 y 8.0. Según la literatura [90,91], el pH normal de la orina en ratones sanos suele oscilar entre 5.0 y 7.5 (aunque puede variar por distintos factores, como, por ejemplo, la dieta), por lo que podemos decir que los valores registrados en este estudio se encuentran en su mayoría en el extremo superior del rango normal y, en algunos casos, lo superan. Después, todas las muestras de orina se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante

conservando un volumen de 50-100 µL para resuspender el sedimento. Se utilizó una gota de suspensión para realizar análisis de sedimento en fresco y otra para extendidos. Posteriormente los sedimentos se observaron al microscopio, primero con un objetivo 10X para tener una visión amplia de los campos y, después, con un objetivo 40X para tener más detalle de los campos como podemos observar en la Figura 34.

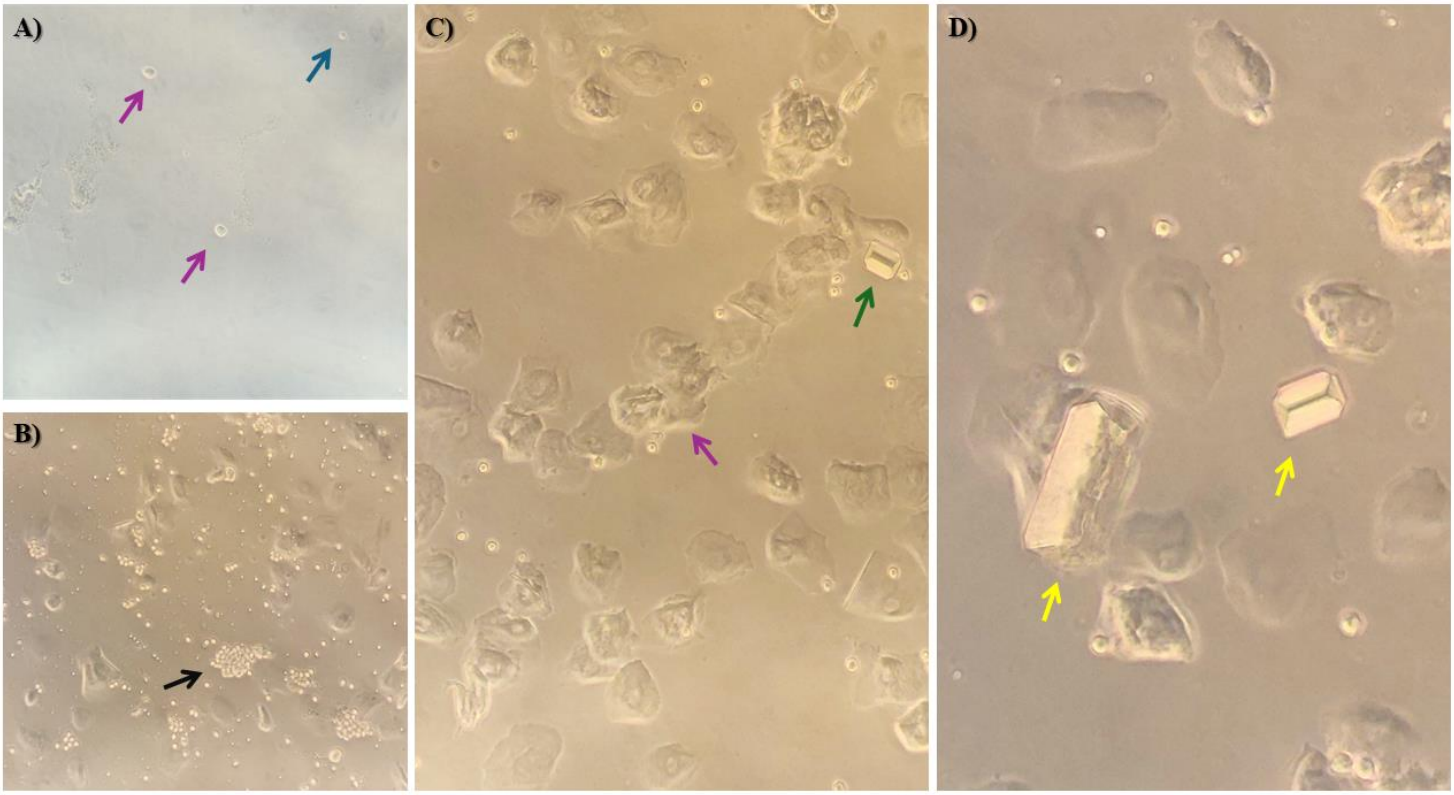

Figura 34. Análisis de sedimento urinario en fresco. **A)** Muestra de orina del grupo control sin cáncer de vejiga: sedimento normal, presencia de escasas bacterias, 1-2 leucocitos por campo (flechas púrpuras), 1-2 eritrocitos por campo (flecha azul). **B-C)** Muestra de orina del grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14** (ratón 3): **B)** sedimento con presencia de abundantes eritrocitos (flecha negra), **C)** sedimento con presencia de abundantes células (flecha púrpura) y presencia de cristales de estruvita (flecha verde). **D)** Muestra de orina del grupo con cáncer de vejiga tratado con vehículo (ratón 3): presencia de cristales de estruvita (flechas amarillas). Campos microscópicos vistos con un objetivo 40X.

Durante la observación microscópica del sedimento urinario se identificaron cristales de estruvita (fosfato amónico magnésico) (Figura 34 C y D) en 3 muestras de los grupos con cáncer (ratón 3 y 4 del grupo tratado con vehículo, y ratón 3 del grupo tratado con **MV14**)

de las 10 analizadas. La identificación de cristales de estruvita es particularmente relevante en un contexto de pH alcalino, lo que es consistente con los pH registrados de las muestras de orina recolectadas en nuestros animales con cáncer de vejiga. La formación de cristales en estas muestras podría estar relacionada con cambios metabólicos inducidos por el tumor, por lo que la alcalinización de la orina podría ser una respuesta del organismo al proceso neoplásico.

También, en el análisis de sedimento en fresco de las orinas de ambos grupos con cáncer de vejiga se observaron abundantes células epiteliales, eritrocitos y leucocitos (Figura 35), lo que nos sugiere la presencia de una lesión, inflamación o irritación que podría estar asociado al proceso neoplásico o también al procedimiento de instilación intravesical, ya que al momento de introducir el catéter se pudo generar irritación o alguna lesión, así como el arrastre de bacterias hacia el interior de la vejiga, lo que podría favorecer una infección.

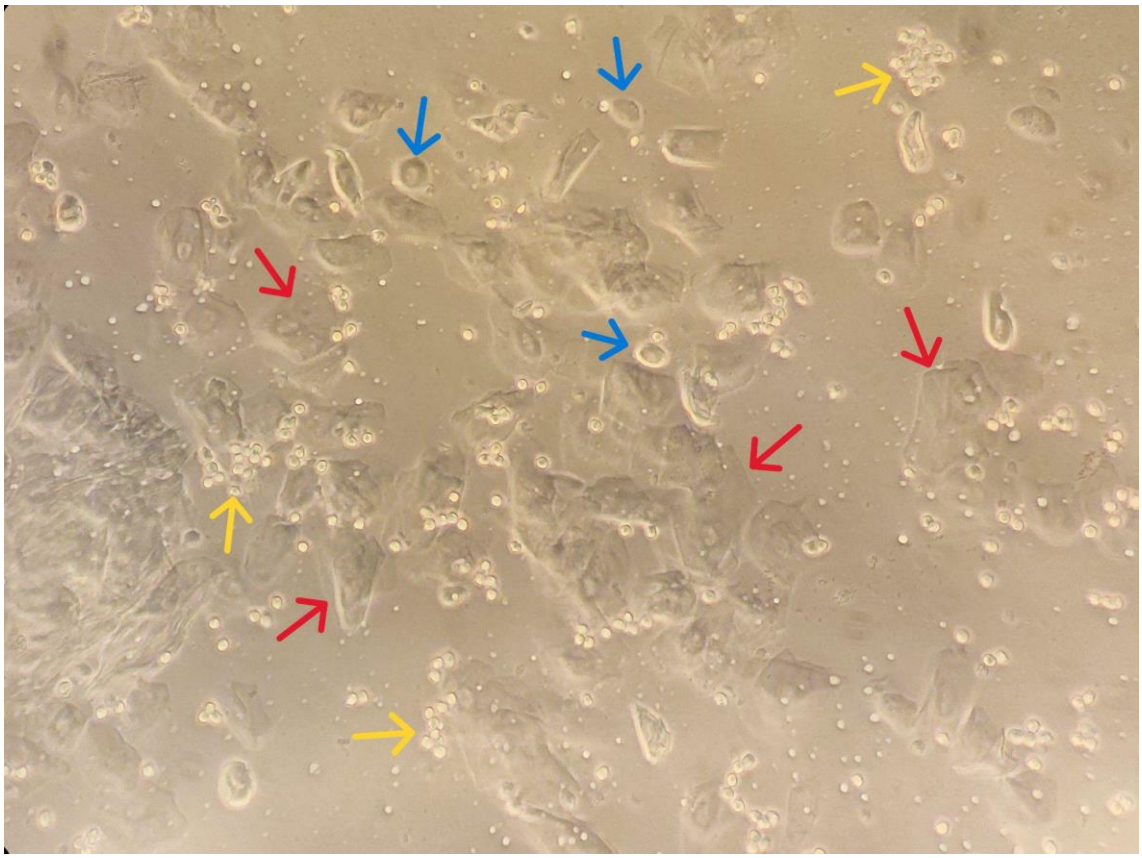

Figura 35. Muestra de orina perteneciente al ratón 4 del grupo con cáncer tratado con **MV14** donde se observa la presencia de abundantes células epiteliales (flechas rojas),

abundantes eritrocitos (flechas amarillas) y leucocitos (flechas azules). Campo microscópico observado con un objetivo 40X.

La presencia de abundantes células epiteliales en la mayoría de las muestras analizadas de los grupos con cáncer de vejiga nos sugiere una descamación del epitelio urinario, lo cual es común en casos de inflamación o irritación crónica. La morfología de las células observadas en el sedimento es clave para diferenciar entre células epiteliales normales o posibles células atípicas que puedan sugerir malignidad.

Debido a la limitación de poder identificar con precisión la morfología celular observada anteriormente, complementamos el análisis realizando extendidos de orina con el objetivo de identificar y caracterizar citológicamente las células presentes. Las muestras fueron teñidas con Giemsa y analizadas bajo el microscopio utilizando un objetivo 40X y 100X.

En general, como se observa en las Figuras 36 y 37 las células se encontraban en grupos cohesivos y en ocasiones en pequeñas asociaciones sueltas en la mayoría de los extendidos analizados de ambos grupos con cáncer. Los núcleos presentan un tamaño aumentado, algunos núcleos son redondeados mientras que otros tienen contornos irregulares, además, algunos de los núcleos observados tienen una coloración oscura intensa (hipercromática), lo cual podría ser indicativo de un alto contenido de ADN. Se identificaron algunas células multinucleadas (Figura 36A y 37A), lo cual podría ser indicativo de una disfunción en la mitosis, fenómeno que se observa comúnmente en células cancerosas. En algunos núcleos se observa la presencia de nucleolos (Figura 36D), esta es una característica frecuentemente asociada con células en alto grado de actividad mitótica. La distribución de la cromatina dentro del núcleo es irregular y gruesa, lo que podría ser un indicativo de una actividad celular anormal. El citoplasma de las células observadas es abundantemente basofílico, por lo que se tiñe intensamente de azul con la tinción de Giemsa, esto podría indicar una alta producción de proteínas, se observaron también algunos citoplasmas vacuolados. Las células muestran variabilidad en tamaño y forma en ambos grupos con cáncer de vejiga, tanto en los núcleos como en el citoplasma, lo que se le conoce como pleomorfismo. El pleomorfismo celular y nuclear es un signo de malignidad, lo que sugiere que las células observadas podrían ser cancerosas.

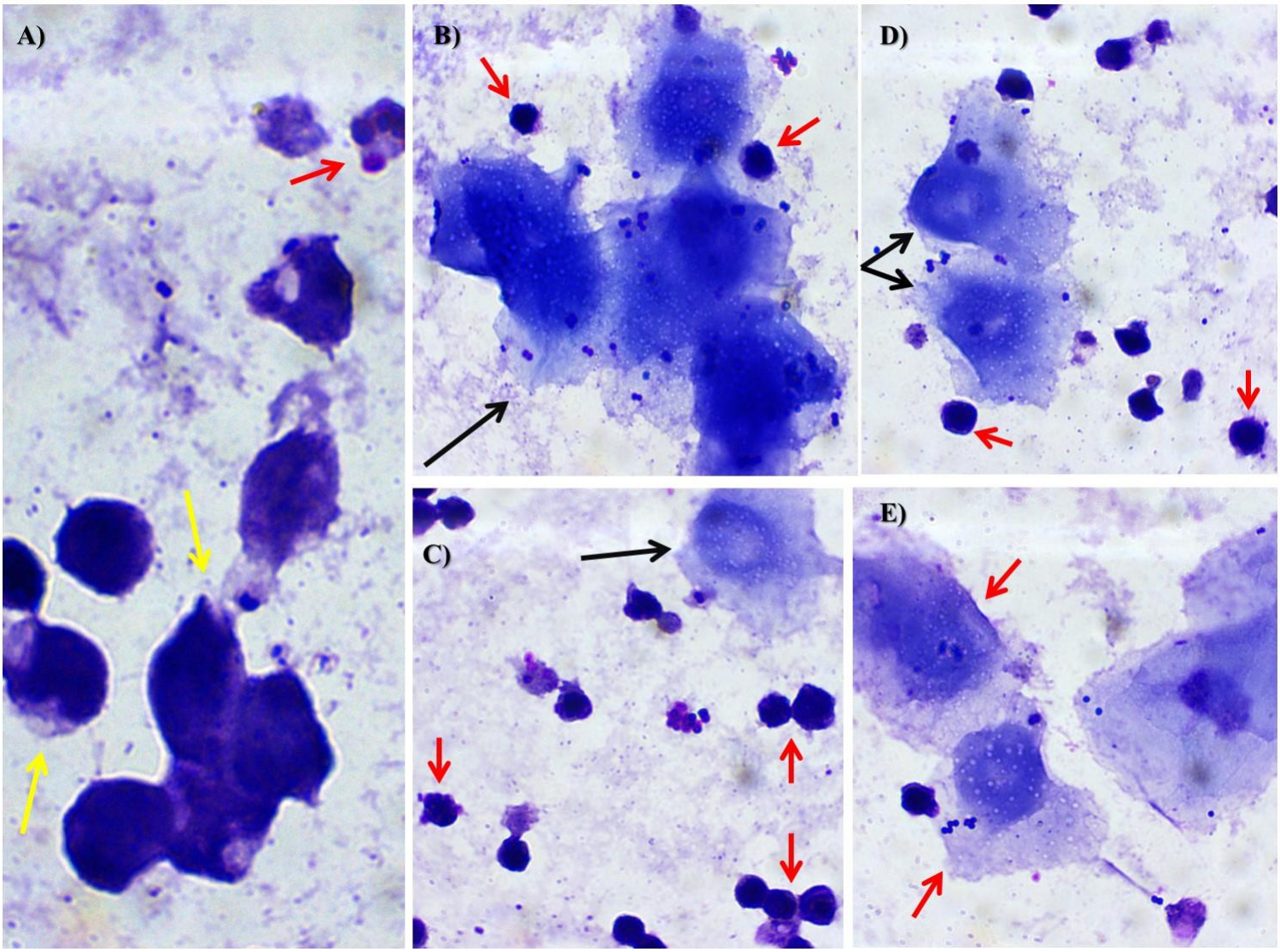

Figura 36. Muestra de orina perteneciente al ratón 2 del grupo con cáncer de vejiga tratado con vehículo. **A)** células de tamaño variado, con núcleos grandes y densos (flechas amarillas), presencia de una célula multinucleada (flecha roja). **B)** grupo de células epiteliales es cohesión, con núcleos grandes y heterogéneos (flecha negra), presencia de leucocitos (flechas rojas). **C)** célula con núcleo agrandado y heterocromático (flecha negra), presencia de leucocitos (flechas rojas). **D)** grupo células con núcleos grandes y heterogéneos, con nucleolos prominentes (flechas negras), presencia de leucocitos (flechas rojas). **E)** grupo de células en cohesión, con núcleos grandes, pleomórficos y con cromatina densa (flechas rojas). Campos microscópicos observados con objetivo 100X.

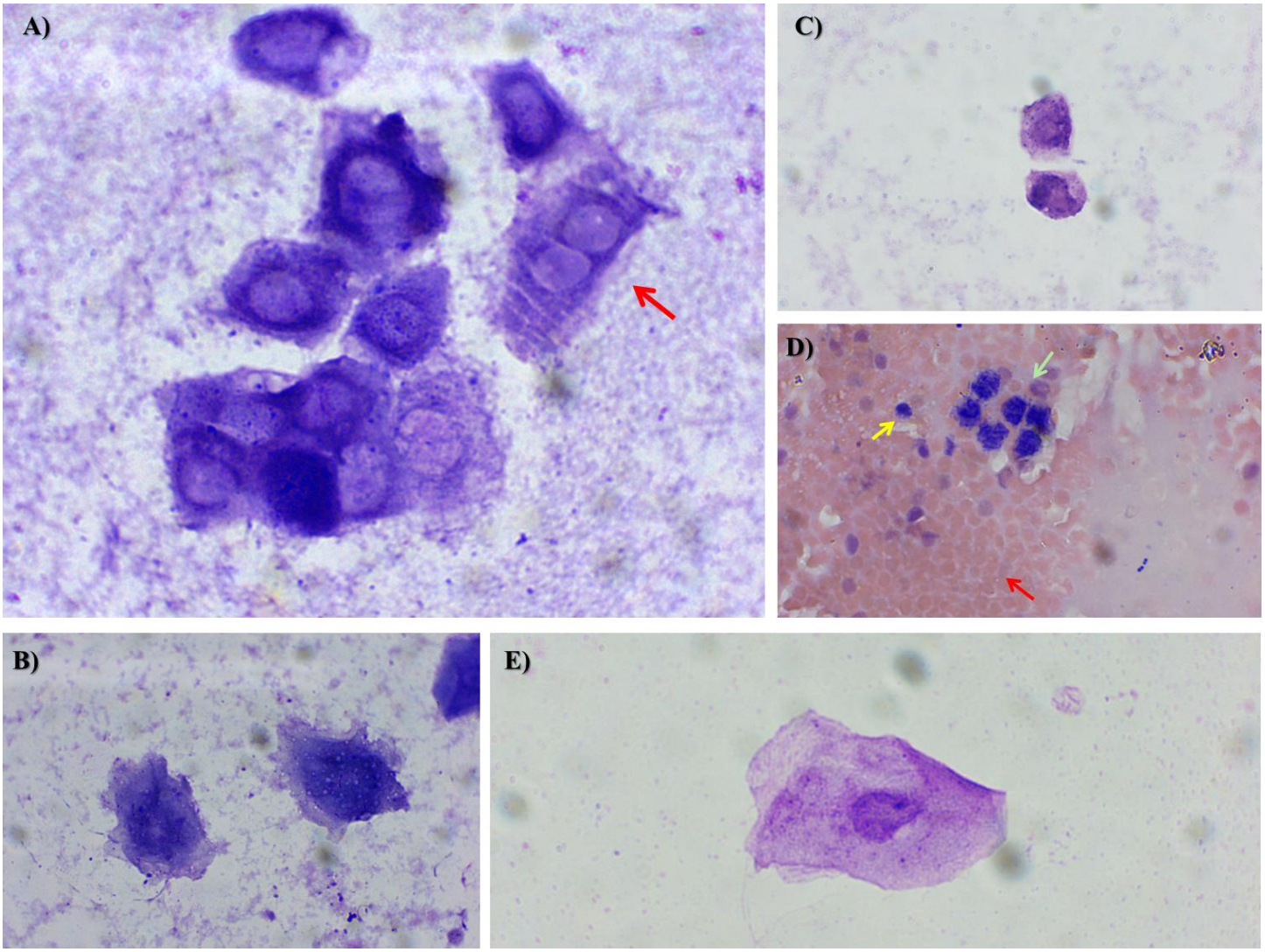

Figura 37. A-B) Muestras de orina del grupo cáncer de vejiga tratado con vehículo (ratón 3 y 5): **A)** grupo de células en cohesión con núcleos prominentes, de tamaño irregular, la flecha roja indica una célula multinucleada. **B)** dos células con núcleos agrandados y escaso citoplasma. **C-D)** Muestra de orina del grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14** (ratón 2 y 4): **C)** dos células con núcleos relativamente grandes y escaso citoplasma (posibles células intermedias o basales). **D)** conglomerado de células con características mixtas, núcleos grandes, hipercromáticos (flecha verde), presencia de leucocitos (flecha amarilla), la flecha roja indica la presencia de abundantes eritrocitos en todo el campo. **E)** Muestra de orina del grupo normal (sin cáncer de vejiga): célula epitelial normal, con núcleo pequeño y abundante citoplasma. Campos microscópicos observados con objetivo 100X.

Los hallazgos citológicos observados en los extendidos de orina de los animales con cáncer de vejiga, tanto en tratado con vehículo como el tratado con **MV14**, son altamente

sugestivos de una malignidad, lo que sería consistente con la inducción de cáncer de vejiga en los animales mediante el uso del carcinógeno BBN. Típicamente, las células uroteliales normales (Figura 37E) tienen un núcleo pequeño, uniforme, y un citoplasma claro con poca basofilia, no presentan pleomorfismo ni núcleos hipercromáticos, por lo tanto, el pleomorfismo celular y nuclear, la hipercromasia, la presencia de nucleolos y la vacuolización citoplasmática observada en las células presentes en las muestras de orina de nuestros animales expuestos al carcinógeno BBN podrían ser indicativos neoplasia. La observación de este tipo de celularidad en la orina nos podría estar indicando que el proceso tumoral ha avanzado hasta el punto de que células malignas están siendo exfoliadas en la orina. Este hallazgo es clínicamente relevante, ya que puede ser utilizado como marcador de progresión tumoral en la práctica clínica.

En resumen, la observación de células con características morfológicas malignas en los extendidos de orina de ambos grupos expuestos al carcinógeno BBN, junto con la presencia de cristales de estruvita y pH elevado, estarían indicando una fuerte correlación con la progresión de cáncer de vejiga inducido mediante el carcinógeno BBN.

5.12.4. Cuantificación de células sanguíneas mediante biometría hemática

La biometría hemática es una herramienta fundamental en la investigación y diagnóstico clínico del cáncer y otras patologías, proporciona una visión integral del estado inmunológico, inflamatorio y general del paciente o modelo de estudio, estos son factores clave para conocer la progresión del cáncer y la efectividad de las terapias. La biometría hemática proporciona información sobre los diferentes tipos de células sanguíneas, incluyendo linfocitos, neutrófilos y monocitos. Este tipo de células son fundamentales en la respuesta inmunitaria, y los cambios en el número de estas células presentes en sangre pueden indicar una alteración del sistema inmunológico, lo cual es relevante en el contexto del cáncer.

En el cáncer de vejiga, un hemograma puede revelar la presencia de inflamación, por ejemplo, un aumento en el número de neutrófilos y monocitos suele estar asociado con una respuesta inflamatoria crónica, la cual puede contribuir a la progresión del tumor y a un peor pronóstico. También, un hemograma permite monitorear los efectos de los tratamientos anticancerígenos, como la quimioterapia o nuevas moléculas bioactivas en estudio, ayudando a ajustar la dosis o cambiar el tratamiento en caso de que se detecten

toxicidades hematológicas como neutropenia, linfopenia o anemia. Algunas alteraciones en el hemograma, como un alto índice neutrófilo/linfocito, se han asociado con un peor pronóstico en varios tipos de cáncer. Por lo tanto, la biometría hemática no solo es un estudio de diagnóstico, sino también de pronóstico, ayudando a predecir la evolución de la enfermedad.

Se realizó una cuantificación de células sanguíneas mediante estudios de biometría hemática, la sangre de los animales fue recolectada en tubos con anticoagulante EDTA y enviada al laboratorio clínico para su procesamiento. En este estudio se evaluó la población de linfocitos, neutrófilos y monocitos en sangre periférica de los tres grupos de animales: grupo normal (sin cáncer de vejiga), grupo con cáncer de vejiga instilado con el vehículo y el grupo con cáncer de vejiga instilado con el compuesto **MV14**. Los resultados obtenidos nos muestran variaciones en las poblaciones de estas células inmunitarias (Figura 38).

El análisis de la población de linfocitos mostró una disminución significativa en los grupos con cáncer de vejiga (grupo tratado con vehículo y grupo tratado con **MV14**) en comparación con el grupo normal. Esto podría estar relacionado con la inmunosupresión causada por el compuesto BBN [81,92,93]. Es sabido que el cáncer puede desencadenar una serie de respuestas inmunitarias que incluyen la disminución de la producción de linfocitos o su redistribución hacia los sitios del tumor, lo que se traduce en una reducción de los linfocitos circulantes en sangre periférica. Tanto el grupo tratado con el vehículo como con **MV14** mostraron una tendencia a tener un porcentaje de linfocitos más bajo que el grupo normal, es decir, el grupo sin cáncer de vejiga. El grupo tratado con **MV14** no mostró diferencias significativas respecto al grupo tratado con vehículo, lo sugiere que **MV14** no parece revertir la disminución de linfocitos causada por el cáncer. Es importante destacar que la reducción de linfocitos podría estar asociada con la progresión tumoral y la respuesta inflamatoria crónica que se genera en presencia del tumor, lo cual puede exacerbar la inmunosupresión.

En el caso de la población de neutrófilos y monocitos no se observan diferencias significativas entre los distintos grupos. La falta de cambios significativos en la población de neutrófilos nos podría estar indicando que ni la progresión del cáncer ni el tratamiento con **MV14** tienen un impacto notable en la respuesta aguda, que está mediada por estas células. Por otro lado, aunque se observa una disminución en la población de monocitos

en el grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14**, esta no es estadísticamente significativa en comparación con los otros grupos (grupo normal sin cáncer y grupo con cáncer tratado con vehículo). Estos resultados nos sugieren que la reducción de la población de monocitos en el grupo tratado con **MV14** podría estar relacionada con el efecto del tratamiento en la modulación de la respuesta inmune. Los monocitos juegan un papel crucial en la inflamación crónica y la inmunidad adaptativa, y esta disminución podría sugerir un efecto antiinflamatorio por parte del tratamiento con **MV14**. Es importante destacar que, aunque la inflamación crónica es un mecanismo de defensa natural, en el contexto del cáncer, una inflamación crónica puede ser perjudicial. Esta reducción de monocitos sugiere que **MV14** podría estar interfiriendo en esta inflamación crónica y posiblemente creando un entorno menos favorable para el crecimiento tumoral, lo que podría ser beneficioso.

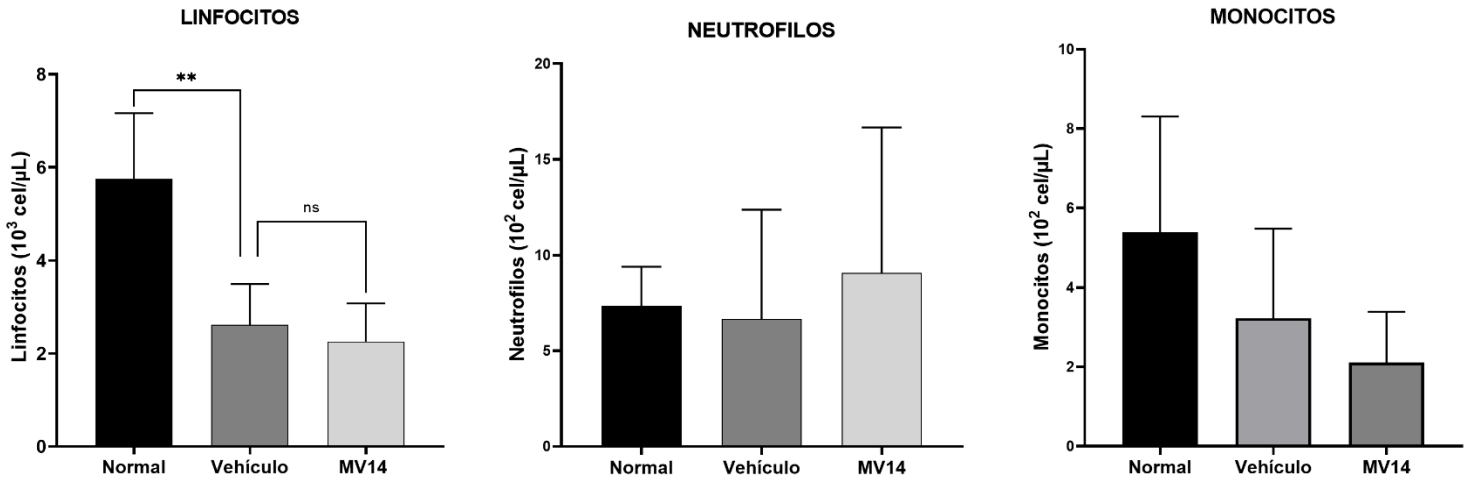

Figura 38. Cuantificación de células en sangre periférica de las poblaciones de linfocitos, neutrófilos y monocitos. El gráfico presenta la media ± desviación. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando one-way ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey con ** p = 0.0016, ns = 0.8555.

El perfil inmunológico observado en nuestro estudio es similar al observado en los estudios realizados por Hori y col. (2017) [81]. En ambos estudios se muestra una disminución significativa en la población de linfocitos en los grupos con cáncer comparado con los valores del grupo normal. En el artículo publicado por Hori y col. se reportó que la quimioterapia intravesical con mitomicina C en el modelo de cáncer de vejiga inducido por BBN desencadena una respuesta inmunosupresora, reduciendo la población de linfocitos circulantes. En nuestro estudio, observamos la disminución de

linfocitos para el grupo tratado con vehículo respecto al grupo normal, lo que respalda la idea de que la inducción del cáncer de vejiga mediante BBN genera inmunosupresión a través de la redistribución de linfocitos hacia el tumor o por una posible alteración en su producción. Por otra parte, la ausencia de diferencias significativas en la población de linfocitos entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con **MV14** sugiere que el compuesto no revierte el efecto inmunosupresor del cáncer, algo que también concuerda con los hallazgos de Hori y col., donde la quimioterapia intravesical con agentes utilizados comúnmente en el tratamiento (BCG, mitomicina C, gemcitabina, etc.) tampoco restauró los niveles normales de linfocitos.

En cuanto a la población de neutrófilos, en el trabajo de Hori y col. se describe un aumento en la respuesta inflamatoria aguda mediada por estas células tras el tratamiento intravesical con quimioterápicos convencionales, lo que estaría indicando un impacto significativo en la activación del sistema inmune innato. Sin embargo, en nuestro estudio si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la población de neutrófilos entre los diferentes grupos, si podemos apreciar que existe una tendencia al aumento de la población de neutrófilos entre el grupo vehículo y el grupo **MV14**.

En cuanto a la población de monocitos, los resultados de Hori y col. no informan cambios significativos después del tratamiento intravesical con los quimioterápicos convencionales BCG y mitomicina C, aunque se logra apreciar una disminución tras el tratamiento con mitomicina C. En nuestro caso, observamos una ligera disminución en los monocitos en el grupo tratado con **MV14**, aunque no fue estadísticamente significativa, siendo similar al trabajo reportado (Hori y col, 2017). Esto podría estar relacionado con una modulación de la respuesta inflamatoria crónica, lo que sugiere que el compuesto **MV14** podría tener un efecto antiinflamatorio más específico, posiblemente mediante la regulación de la inmunidad innata. Dado que la inflamación crónica puede favorecer la progresión tumoral, la reducción en la población de monocitos podría ser indicativa de un entorno menos propicio para el crecimiento tumoral.

Estos resultados preliminares nos abren la posibilidad de seguir evaluando el efecto de **MV14** en este modelo murino, no solo en la modulación de la inmunidad, sino también su potencial antitumoral a largo plazo, probando otras condiciones de tratamiento, incluyendo fármacos de referencia, como por ejemplo mitomicina C, utilizados en la práctica clínica para el tratamiento intravesical del cáncer de vejiga, y realizar análisis

adicionales para evaluar si estos cambios en las poblaciones celulares tienen correlación con la eficacia del tratamiento.

5.12.5. Cuantificación de la citoquina pro-inflamatoria (IL-17A) en suero y orina mediante ELISA.

La interleucina 17A (IL-17A) es una citoquina proinflamatoria fundamental en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, especialmente en patologías inflamatorias y cáncer. En el contexto del cáncer de vejiga, el papel de la IL-17A es de gran interés debido a su capacidad para promover la inflamación crónica, que a su vez puede facilitar la progresión tumoral y la metástasis [45,81]. La cuantificación de IL-17A en suero y orina ayudaría a comprender cómo las respuestas inmunitarias influenciadas por esta citoquina afectan el desarrollo y el tratamiento de esta enfermedad, además de ayudar a evaluar la eficacia de nuevas terapias emergentes en la modulación de la inflamación y la respuesta inmunitaria en pacientes con cáncer de vejiga.

La cuantificación de la citoquina en el suero y la orina de los animales se realizó mediante ELISA. En los resultados obtenidos para los valores séricos de IL-17A (Figura 39, A)) podemos observar una disminución significativa de IL-17A en el grupo con cáncer de vejiga tratado con vehículo en comparación con el grupo normal. Esto sugiere que posiblemente el cáncer de vejiga inducido por BBN sería capaz de alterar la respuesta inflamatoria sistémica. El grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14** muestra un aumento significativo en los niveles séricos de IL-17A comparado con el grupo tratado con vehículo. Este resultado sugiere que **MV14** podría revertir la inmunosupresión inducida por el cáncer, activando vías inflamatorias sistémicas que involucran esta citoquina.

En los resultados para los valores de IL-17A en orina (Figura 39, B)), podemos observar que el grupo tratado con vehículo presenta niveles significativamente menores de IL-17A en comparación con el grupo normal. Esto sugiere que la presencia del cáncer de vejiga no sólo suprime las respuestas inflamatorias sistémicas, sino que también las locales en el tracto urinario. El grupo tratado con **MV14** muestra un aumento significativo de IL-17A en la orina en comparación con el grupo tratado con vehículo. Esto podría ser indicativo de que **MV14** no solo induce una respuesta inflamatoria sistémica, sino que

también local en la vejiga, y que el compuesto podría estar revirtiendo la inmunosupresión del cáncer inducido con BBN.

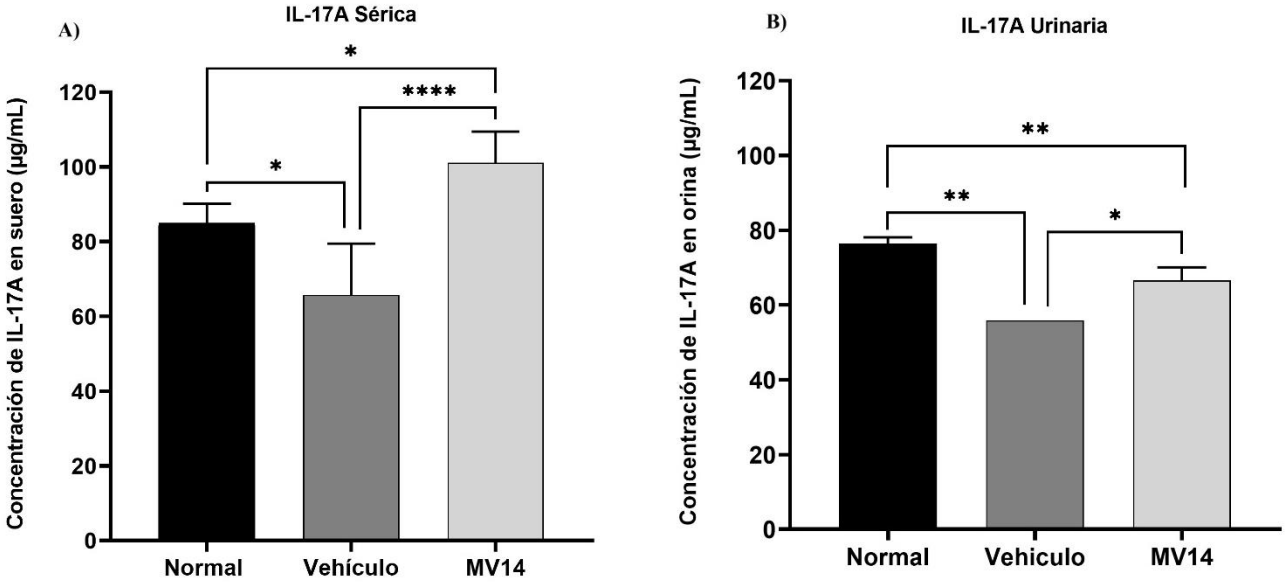

Figura 39. Cuantificación de la concentración de IL-17A. A) Sérica, B) Urinaria. El gráfico presenta la media ± desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando one-way ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey con * $p = 0.0219$, ** $p = 0.0067$, **** $p < 0{,}0001$.

La cuantificación de la IL-17A en muestras de suero y orina en nuestro estudio concuerdan con los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Hori y col. [81]. En nuestro estudio, los niveles séricos de IL-17A en el grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14** mostró un aumento pronunciado, lo que podría estar indicando una activación inmunológica sistémica desencadenada por el tratamiento. De manera similar, en el trabajo realizado por Hori y col. reportaron un incremento sérico de IL-17A en ratones con cáncer de vejiga después del tratamiento con quimioterapia intravesical (BCG y mitomicina C). Este grupo observó que el tratamiento con quimioterapia intravesical de ratones con cáncer inducido con BBN, estimulaba una respuesta inmunológica sistémica marcada, donde esta citoquina desempeña un papel importante en la activación del sistema inmunológico.

En cuanto a los niveles de IL-17A en orina, en nuestro estudio el grupo tratado con **MV14** presentó un aumento significativo de los niveles de esta citoquina, siendo similar a lo observado en el trabajo realizado por Hori y col., donde, después del tratamiento con BCG, los valores de IL-17A aumentan significativamente respecto al grupo control,

mientras que, después del tratamiento con mitomicina C los valores disminuyen significativamente.

Ambos estudios sugieren que la IL-17A es un marcador clave en la respuesta inmune tanto a nivel sistémico como local en modelos de cáncer de vejiga inducidos por BBN. Aunque los tratamientos son diferentes, podemos destacar que el compuesto **MV14** genera un efecto similar a los tratamientos convencionales utilizados en la quimioterapia intravesical en el trabajo realizado por Hori y col. desencadenando un aumento de IL-17A, lo que resalta su importancia en la inmunomodulación. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios adicionales para esclarecer completamente el papel de la IL-17A en la eficacia del tratamiento con **MV14.**

5.12.6. Estudios histopatológicos

Los análisis histológicos son una herramienta esencial en la investigación biomédica, especialmente en el estudio y desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer. A través de estos análisis, se pueden examinar las estructuras celulares y tisulares con un alto grado de detalle, lo que permite identificar cambios morfológicos, la presencia de células malignas, y la respuesta de los tejidos a diferentes tratamientos. La importancia de los análisis histológicos radica en su capacidad para ofrecer una visión directa del efecto de un fármaco a nivel celular y tisular. Esto es particularmente relevante en la investigación oncológica, donde la evaluación de la eficacia y seguridad de un tratamiento requiere una comprensión profunda de cómo afecta a las células cancerosas y al entorno tumoral. Además, la histología permite detectar y caracterizar procesos como la apoptosis, la necrosis y la proliferación celular, que son fundamentales para determinar el potencial terapéutico de un nuevo compuesto en estudio. En el contexto de la investigación de nuevos fármacos contra el cáncer, los análisis histológicos permiten una evaluación crítica de los efectos del tratamiento a nivel microestructural, proporcionando datos cruciales para la validación preclínica y el desarrollo de terapias más eficaces y seguras.

Al momento de realizar las necropsias se recolectaron las vejigas de los tres grupos de animales (ratones sanos, ratones con cáncer de vejiga tratados con vehículo y ratones con cáncer tratados con **MV14**) de las cuales se tomó registro del aspecto macroscópico y del peso (Figura 40), donde podemos observar que los tamaños son similares en todos los

grupos y no hubo cambios significativos en el peso de las vejigas. Además, se recolectaron los riñones de dos ratones del grupo con cáncer tratado con **MV14** (ratón 1 y 3) los cuales presentaban anormalidades, así como los riñones del ratón 1 del grupo normal (Figura 41) para realizar estudios histopatológicos.

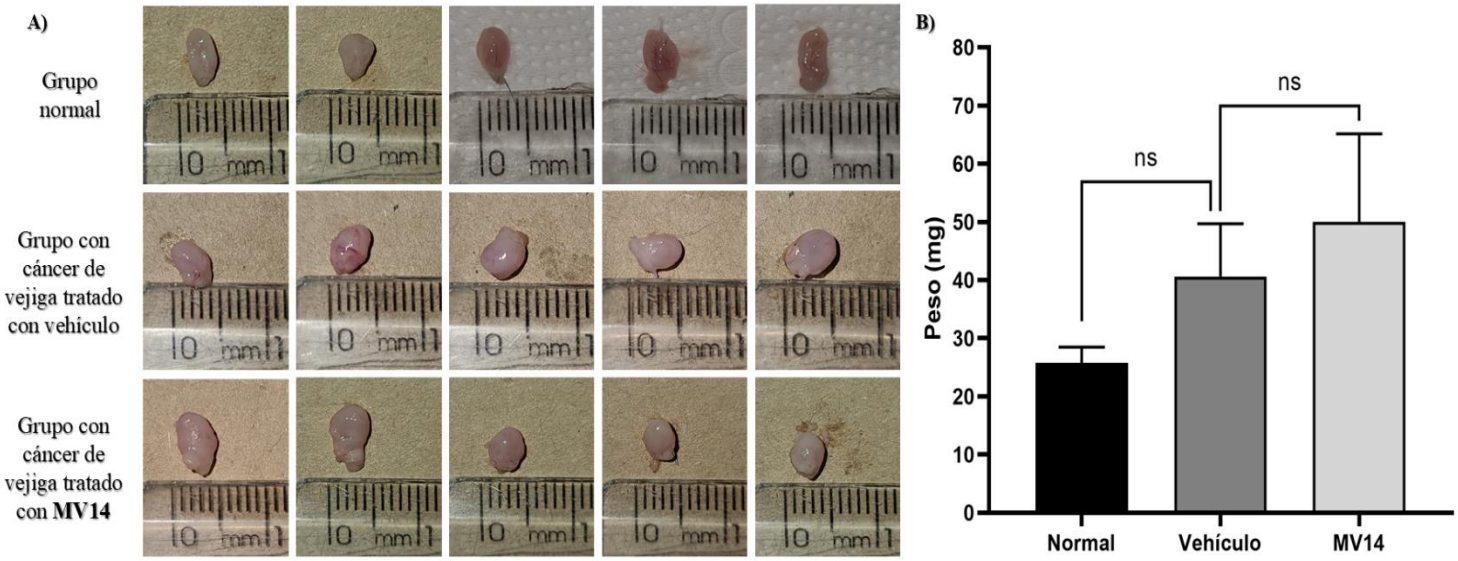

Figura 40. A) Aspecto macroscópico de las vejigas de los tres grupos de animales. **B)** Gráficos del peso de las vejigas pertenecientes a cada grupo. El gráfico presenta la media ± desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando one-way ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey con ns = 0.0991 y 0.3514.

Figura 41. Aspecto macroscópico de los riñones pertenecientes al ratón 1 del grupo normal, y riñones del ratón 1 y 3 del grupo con cáncer de vejiga tratados con **MV14.**

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina fueron digitalizados utilizando el escáner Motic EasyScan One para su posterior análisis. Los cortes histológicos de las vejigas se muestran en la Figura 42. En general, para los cortes histológicos del grupo normal se observa una arquitectura bien conservada de la vejiga urinaria. La mucosa está intacta, con un epitelio de transición (urotelio) uniforme y bien organizado. Las células del epitelio son homogéneas, con núcleos regulares. El estroma subyacente muestra una cantidad normal de fibras colágenas y vasos sanguíneos. No se observan signos de malignidad como pleomorfismo celular, mitosis atípica o invasión del estroma.

Para el grupo con cáncer de vejiga tratado con vehículo se observan alteraciones en la estructura general de la vejiga. El urotelio está engrosado y desorganizado, con áreas de hiperplasia. Las células muestran pleomorfismo, con núcleos agrandados e irregulares, indicativo de displasia. Se observa incremento en la actividad mitótica. En algunos cortes se observa la posible invasión del estroma por células atípicas, lo que sería sugestivo de un carcinoma urotelial *in situ* o invasivo. Esto podría indicar que el carcinógeno BBN ha inducido cambios cancerosos en la vejiga.

En los cortes del grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14**, aunque hay alteraciones, parecen ser levemente menos graves que en el grupo tratado con vehículo. Se observa una leve disminución en la disrupción del urotelio en comparación con el grupo tratado con

vehículo. Se observa pleomorfismo y núcleos agrandados, pero en un grado levemente menor que el grupo tratado con vehículo. Se observan áreas donde el epitelio pareciera estar en proceso de regeneración o reparación. Aunque persisten células atípicas, la invasión del estroma parece levemente menos pronunciada, lo que podría indicar que el tratamiento con **MV14** generó un posible efecto supresor sobre la progresión del cáncer inducido por el carcinógeno BBN.

En general, este análisis sugiere que **MV14** posiblemente podría estar ejerciendo un efecto terapéutico al limitar la severidad de la displasia y la invasión cancerosa en la vejiga, aunque no elimina completamente las células atípicas. Sería útil complementar este análisis histológico con estudios con marcadores moleculares para confirmar estos hallazgos.

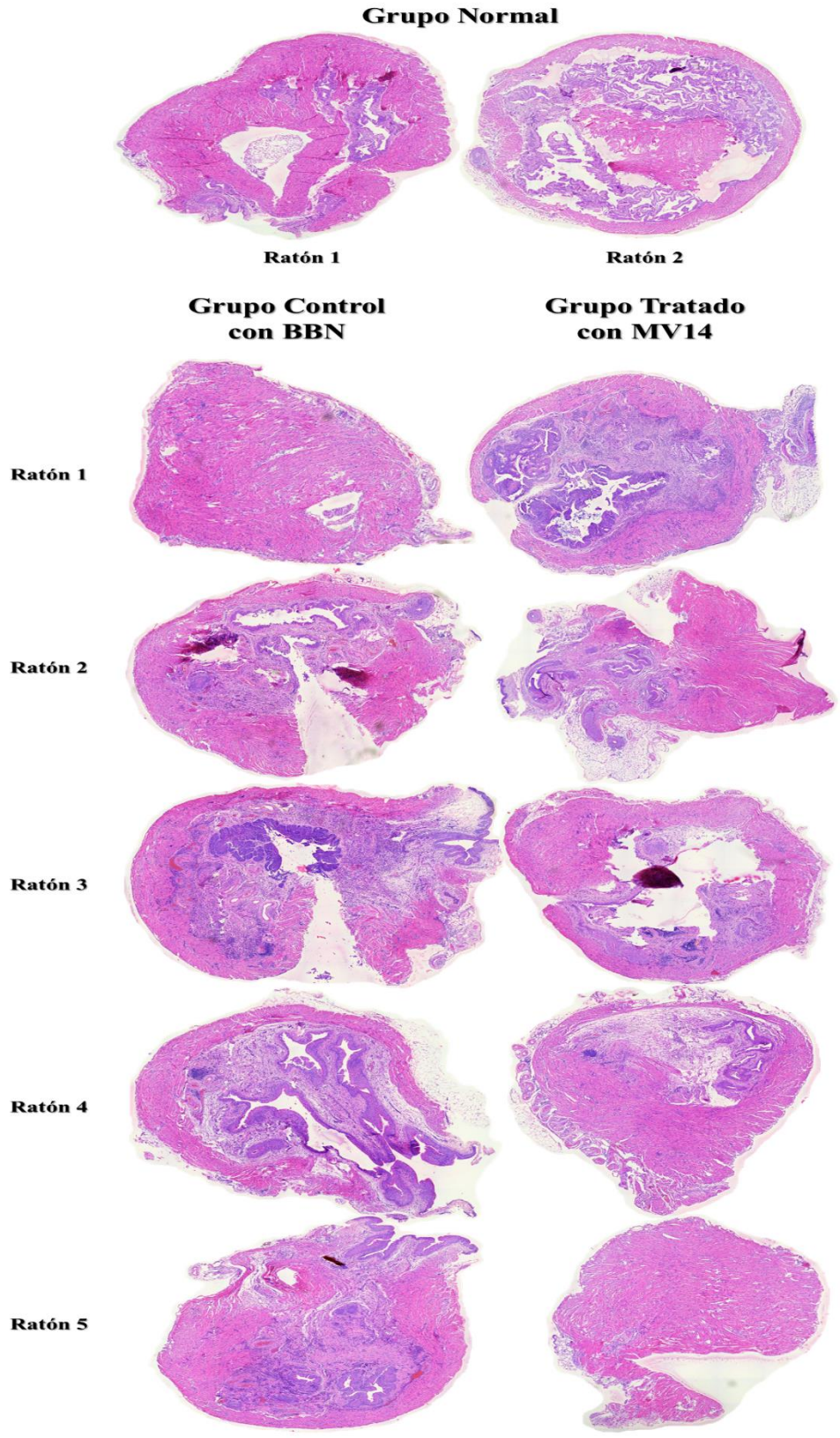

Figura 42. Evaluación histopatológica de las vejigas del grupo normal, grupo con cáncer de vejiga tratado con vehículo y tratado con **MV14**. Muestras teñidas con hematoxilina-eosina digitalizadas en un aumento 4X.

Por otro lado, los cortes histológicos de los riñones se muestran en la Figura 43. En los cortes histológicos correspondientes al grupo normal, se observa una arquitectura renal bien preservada. Los glomérulos están claramente delineados, con una disposición compacta y regular de las células endoteliales y podocitos. Los túbulos renales presentan una organización ordenada, con células epiteliales cúbicas de citoplasma homogéneo y núcleos basófilos, sin evidencia de inflamación, necrosis o proliferación anormal. No se identifican signos de malignidad en estos cortes histológicos.

Los riñones del grupo tratado con vehículo no se incluyen en estos estudios debido a que, en las necropsias, durante el análisis visual de los órganos, no se observaron anomalías en el color, tamaño o aspecto general de los riñones de los animales de este grupo, lo que sugiere que no presentaban indicios de daño o cambios patológicos evidentes, por lo que se concluyó que no había una necesidad imperante de realizar histología para confirmar la ausencia de patología.

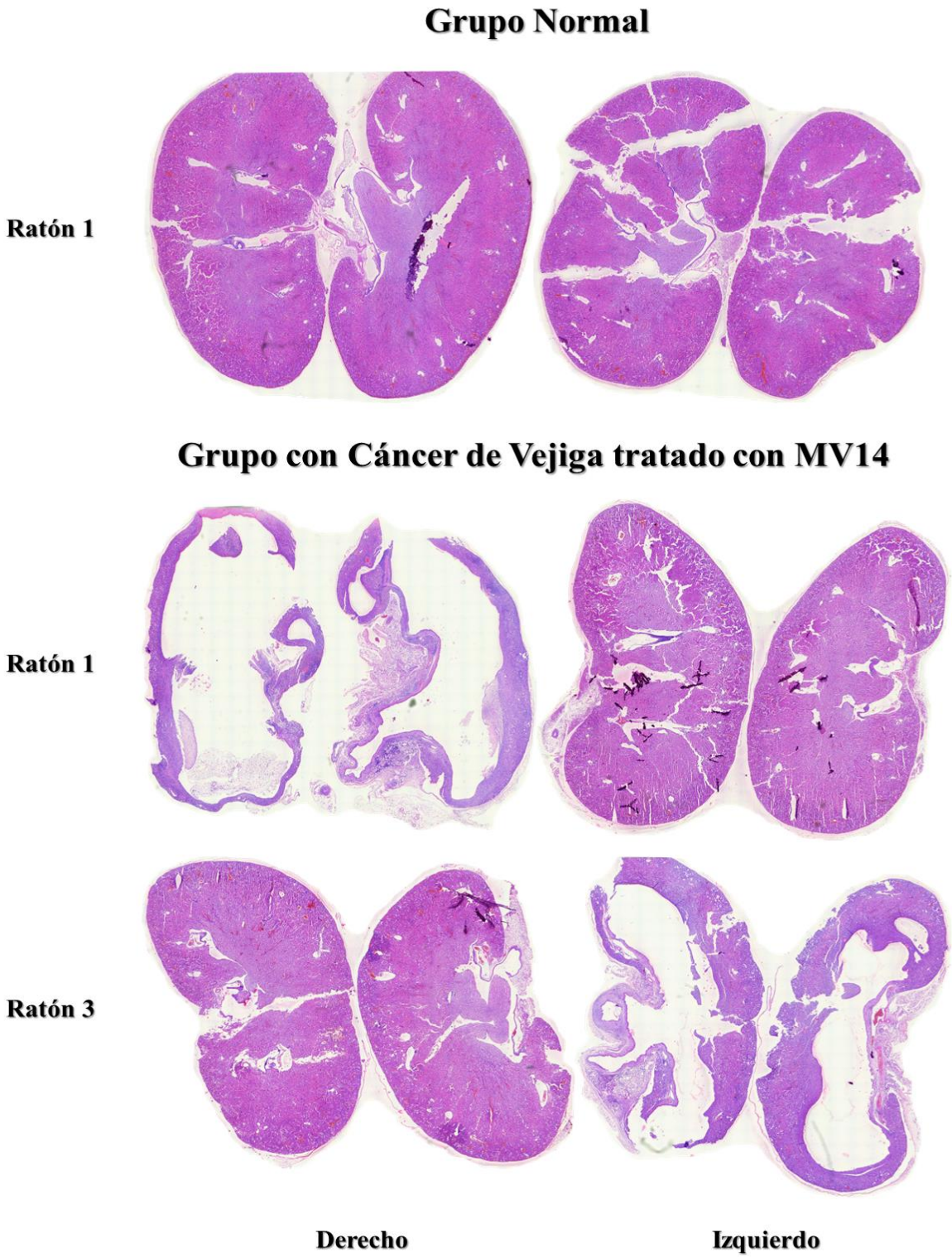

Figura 43. Evaluación histopatológica de los riñones del grupo normal y los riñones del grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14**. Muestras teñidas con hematoxilina-eosina digitalizadas en un aumento 4X.

En el grupo con cáncer de vejiga tratado con **MV14**, dos animales presentaron anomalías macroscópicas en los riñones. Se evidencian diferencias notables en la histología renal en comparación con el grupo normal. Aunque algunos cortes muestran áreas donde la arquitectura renal parece preservada, se observan signos de daño tisular en otras regiones. En ciertas áreas se aprecia infiltración de células inflamatorias, esta infiltración podría estar compuesta por neutrófilos, linfocitos y macrófagos, siendo sugestiva de una respuesta inflamatoria activa. Aunque no se identifica claramente si hay presencia de células malignas, la presencia de proliferación celular en ciertas áreas podría indicar una respuesta tisular anormal, posiblemente relacionada con el carcinógeno BBN. También se observan alteraciones en la estructura glomerular y tubular, con pérdida de la integridad celular en algunas zonas, lo cual podría ser consecuencia directa de la exposición al carcinógeno BBN o quizás debido a un efecto al tratamiento con **MV14**.

Es importante destacar que el compuesto **MV14** fue instilado localmente en la vejiga del animal. Sin embargo, el tratamiento podría haber afectado indirectamente a otros órganos, como los riñones, debido a una posible absorción sistémica del compuesto o a la liberación de factores inflamatorios y mediadores químicos en respuesta al daño tumoral. Es crucial realizar estudios adicionales para confirmar la naturaleza de las células proliferativas observadas y para determinar si el tratamiento con **MV14** afecta directamente a los riñones por una posible absorción sistémica, o si los cambios histológicos observados son una consecuencia del proceso inflamatorio generalizado o bien un daño ocasionado por la exposición al carcinógeno BNN.

6. DISCUSIÓN GENERAL

El cáncer de vejiga es uno de los tipos de cáncer más común en hombres y es un problema de salud a nivel mundial por lo que existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos dirigidos a los mecanismos subyacentes que desencadenan la tumorogénesis, la progresión, resistencia y recurrencia de la enfermedad. Los resultados obtenidos en este trabajo nos muestran que el compuesto **MV14** es estable en un rango de pH biológicamente relevantes, lo que garantiza su eficacia prolongada en entornos como la vejiga, además, la lipofilia del compuesto es sugestiva de un buen equilibrio entre penetración y retención en el epitelio, lo cual es crucial en terapias intravesicales para minimizar riesgos sistémicos. Los estudios realizados en este trabajo destacan a **MV14** como un potente liberador de ·NO con un perfil de liberación controlado y sostenido en el tiempo.

Estos resultados están estrechamente relacionados con la actividad citotóxica de **MV14.** Los valores de CI_{50} de **MV14** observado en las líneas celulares T24 y 253J son menores que los de fármacos de referencia (cisplatino y mitomicina C), logrando una mayor eficacia antitumoral. En los resultados obtenidos para la actividad citotóxica del compuesto **MV14** en la línea celular no tumoral SV-HUC-1, podemos observar que los valores de la CI_{50} de **MV14**, aunque son menores que los de los fármacos de referencia dentro de las primeras 24 horas, se mantienen constantes hasta las 72 horas. En cambio, los valores de la CI_{50} de los fármacos de referencia disminuyen con el tiempo, llegando a ser similares o inferiores a los de **MV14**. Por otro lado, el índice de selectividad de **MV14** muestra una mayor selectividad hacía las células tumorales, especialmente en la línea 253J, comparado con los quimioterápicos convencionales. La capacidad de **MV14** para mantener su selectividad en tiempos prolongados es consistente con su perfil de estabilidad y lipofilia, sugiriendo que el compuesto no sólo es eficaz, sino que podría ser seguro hacia las células no tumorales. Estos resultados son prometedores, sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmar la falta de absorción sistémica. Por otro lado, los resultados obtenidos nos muestran que el compuesto presenta un importante efecto quimiosensibilizador, pudimos observar que el compuesto **MV14** sensibiliza las células cancerígenas al cisplatino, mostrando un efecto sinérgico. La disminución del IC en combinación con cisplatino muestra un efecto sinérgico, especialmente es la línea celular 253J, en la cual se ha demostrado resistencia a este quimioterápico [68,69,87], lo cual es clave para tratar cánceres resistentes a la quimioterapia.

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, se demostró que el compuesto **MV14** inhibe la vía NF-κB, una ruta clave en la progresión del cáncer y la metástasis celular mediante la inducción de la transcripción de genes que promueven el crecimiento celular, la respuesta antiapoptótica y la transición epitelio-mesénquima. En este trabajo demostramos que **MV14** modula la expresión de la survivina, una proteína que promueve la resistencia a la apoptosis y la proliferación celular y que, además, cumple un importante rol en la reparación del daño al ADN a través de la interacción con la maquinaria de reparación del ADN. Cuando los cultivos son tratados con **MV14**, se inhibe tanto la vía NF-κB como la expresión de survivina, haciendo que las células cancerosas sean más sensibles a la quimioterapia, reduciendo su capacidad de sobrevivir y de reparar el daño generado en el ADN. Esto potencia la eficacia del tratamiento combinado, maximizando la destrucción de células tumorales y limitando su capacidad de regeneración. El efecto de **MV14** para generar arresto en el ciclo celular es más evidente en la línea celular 253J. Los ensayos de ciclo celular sugieren que **MV14** induce un aumento de la población celular en fase S en la línea celular 253J, similar al efecto de mitomicina C, lo cual sería indicativo de la capacidad del compuesto para interferir con la división celular. La fase G2/M evita que células con ADN dañado entren en mitosis. Este efecto es consistente con la liberación de ·NO, que daña al ADN y modula vías como NF-κB, impidiendo que las células tumorales progresen hacía la división y favoreciendo su eliminación. Los ensayos de apoptosis realizados confirman la capacidad proapoptótica de **MV14**, induciendo apoptosis tanto en su fase temprana como tardía. Esto refuerza la hipótesis de que la liberación de ·NO inhibe NF-κB y a su vez promueve la apoptosis en células tumorales. Por otro lado, los resultados obtenidos en los ensayos de genotoxicidad fortalecen nuestra hipótesis de trabajo sobre el mecanismo de acción del compuesto. El efecto genotóxico observado, tanto en inmunocitoquímica γ-H2AX como en los ensayos cometa, nos indican que **MV14** induce roturas en el ADN de las células, lo cual sería consistente con la capacidad del compuesto para generar ·NO y generar daño celular. A su vez, la capacidad del ·NO para inhibir la expresión de survivina estaría afectando a las células al limitar su capacidad para reparar el daño inducido por el ·NO liberado de **MV14**. Generando de esta manera un aumento en la fase S del ciclo celular como observamos en nuestro estudio.

Los ensayos de migración celular destacan el potente efecto inhibidor de **MV14** sobre la migración de células cancerosas, un proceso clave en la metástasis del cáncer de vejiga.

Este efecto estaría relacionado con la liberación de ·NO por parte de la molécula, lo que contribuye a la regulación de diversas vías que controlan la motilidad celular. Uno de los mecanismos más relevantes que podría explicar la inhibición de la migración celular por **MV14** es la modulación de la vía NF-κB y la expresión de survivina, la cual facilita la movilidad de las células tumorales, aumentando su capacidad de diseminación y contribuyendo a la progresión tumoral. Se realizaron estudios de expresión de survivina donde los resultados obtenidos de estos estudios demuestran que **MV14** inhibe fuertemente la expresión de esta proteína en las células T24 y 253J, presentando una inhibición más marcada en la línea celular 253J. El impacto de **MV14** en la inhibición de survivina está estrechamente relacionado con los resultados obtenidos anteriormente. La inhibición de la survivina es fundamental, ya que esta proteína está involucrada en la reparación del daño genotóxico, promueve la resistencia a la apoptosis y favorece la progresión tumoral. La modulación en la expresión de esta proteína por parte del compuesto **MV14,** no solo favorece la inducción de apoptosis, sino que también compromete la capacidad de las células cancerosas para reparar el daño en el ADN ocasionado por el ·NO liberado de la molécula. La combinación de estos efectos limita la viabilidad y la migración celular, contribuyendo a reducir la progresión tumoral, lo que refuerza el potencial de **MV14** como un prometedor agente anticancerígeno.

Se realizaron estudios preclínicos de toxicidad y mutagenicidad mediante el test de AMES en los que se demostró que el compuesto **MV14** no es tóxico y no presenta efectos mutagénicos, lo que refuerza su perfil de seguridad tanto para las células sanas del tejido vesical como también en el caso de que el compuesto se absorba a la circulación sistémica. La ausencia de mutagenicidad indica que el compuesto **MV14** podría tener un perfil seguro en su aplicación clínica, al menos en cuanto a la inducción de mutaciones en las cepas bacterianas probadas. Estos resultados, en conjunto con los resultados obtenidos en los ensayos de apoptosis, migración celular y genotoxicidad, son sugestivos de que **MV14** induce daño genotóxico en células tumorales y no representa un riesgo de mutación sistémica en otros contextos biológicos. La ausencia de mutagenicidad en el test de AMES, junto con su capacidad de inducir apoptosis y detener la progresión tumoral en líneas celulares de cáncer de vejiga, refuerza su potencial terapéutico y nos abrió camino hacia el estudio *in vivo* en un modelo murino de cáncer de vejiga.

De la actividad antitumoral *in vivo* del compuesto **MV14** podemos destacar que la metodología empleada para el desarrollo del modelo murino de cáncer de vejiga fue empleada con éxito y el modelo fue desarrollado correctamente. Los estudios de MRI realizados nos confirmaron el desarrollo del cáncer. El tratamiento intravesical con **MV14** mostró una buena tolerancia y seguridad en los animales. La duración y las condiciones de tratamiento permitieron una adecuada interacción de **MV14** con el epitelio vesical, aspecto esencial para evaluar su potencial terapéutico. Los estudios de MRI después de los tratamientos proporcionaron imágenes detalladas del estado de las vejigas de los animales. Si bien la MRI es una herramienta valiosa en la evaluación del cáncer de vejiga, en nuestro caso la extensión avanzada del tumor en toda la cavidad vesical no permitió obtener resultados significativos de estos estudios, limitando la evaluación precisa del impacto del tratamiento en el volumen tumoral. Por otro lado, los análisis complementarios de orina, cuantificación de células sanguíneas y cuantificación de IL-17A fueron de relevancia en este estudio. El análisis de orina nos sugiere que los animales presentaban alteraciones metabólicas relacionadas con la presencia de tumor. La presencia de células atípicas en los extendidos de orina confirma la progresión tumoral en los grupos con cáncer. Además, los análisis de biometría hemática mostraron una disminución en la población de linfocitos, lo cual podría estar relacionada con la inmunosupresión inducida tanto por la ingesta del carcinógeno BBN como por la progresión del cáncer en la vejiga. La cuantificación de IL-17A mostró niveles elevados en suero y orina en el grupo tratado con **MV14**, lo que podría sugerir una posible reactivación de la respuesta inmune, sin embargo, se necesitan estudios adicionales para esclarecer completamente el papel de la IL-17A en la eficacia del tratamiento con **MV14.** Finalmente, los estudios histopatológicos confirmaron la presencia de malignidad en los tejidos de los grupos expuestos al carcinógeno BBN. Si bien existen leves diferencias de la histología de los animales tratados con **MV14** respecto a los animales del grupo tratado con vehículo, hacen falta estudios adicionales para poder confirmar el efecto de **MV14** en el tratamiento intravesical del cáncer de vejiga.

7. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo destacan el potencial terapéutico del compuesto **MV14** para el tratamiento del cáncer de vejiga. El compuesto presenta una notable estabilidad y buena lipofilia, lo que es un factor clave para la eficacia de las terapias intravesicales. **MV14** se posiciona como un potente liberador de ·NO con capacidad para inhibir la expresión de survivina favoreciendo la inducción de apoptosis en células tumorales, así como afectando su capacidad migratoria. La actividad citotóxica de **MV14** fue superior a la de fármacos utilizados en la práctica clínica para el tratamiento del cáncer de vejiga, además, logra sensibilizar las células tumorales en combinación con cisplatino, posiblemente debido a la capacidad para inhibir la vía NF-κB y la expresión de survivina, aumentando la sensibilidad de las células tumorales logrando reducir las concentraciones de quimioterapia. También, **MV14** muestra un fuerte potencial para detener el ciclo celular e inducir la apoptosis, así como para inhibir la migración celular, que es un aspecto crucial en la metástasis del cáncer. Los estudios preclínicos de toxicidad, mutagenicidad y la evaluación *in vivo* indican que **MV14** tiene un perfil seguro al no presentar actividad mutagénica y es bien tolerado en el modelo murino confirmando la tolerancia y la seguridad del tratamiento intravesical.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectiva, seguiremos trabajando en el estudio del mecanismo de acción del compuesto **MV14**, continuaremos con el estudio de la capacidad del compuesto en inhibir el ciclo celular e inducir la apoptosis a través de la inhibición de la expresión de survivina, así como el estudio de la determinación de los niveles de la enzima caspasa-3 activa, la cual es una de las enzimas responsables de la apoptosis, en las líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga. También se harán estudios para cuantificar la penetración del compuesto a distintas dosis en el tejido de la vejiga, para el posterior ajuste de condiciones de tratamiento intravesical con **MV14** a utilizar. Continuaremos con el estudio del modelo murino desarrollado en este trabajo, se plantea realizar un seguimiento de la progresión tumoral mediante MRI y la inclusión del radiotrazador ^{68}Ga-FAPI. Además, se incluirán fármacos de referencia como controles positivos, por ejemplo, mitomicina C, para poder comparar la eficacia del tratamiento con **MV14**.

9. BIBLIOGRAFÍA

[1] Birder L. A. (2014). Urinary bladder, cystitis and nerve/urothelial interactions. Autonomic neuroscience: basic & clinical, 182, 89–94. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.12.005

[2] Shermadou ES, Rahman S, Leslie SW. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Bladder. [Updated 2023 Jul 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531465/

[3] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

[4] International Agency for Research on Cancer. (2024). GLOBOCAN 2024: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2024. Retrieved from https://gco.iarc.fr/

[5] Lopez-Beltran A, Cookson MS, Guercio BJ, Cheng L. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer. BMJ. 2024 Feb 12; 384:e076743. doi: 10.1136/bmj-2023-076743.

[6] Jubber, I., Ong, S., Bukavina, L., Black, P. C., Compérat, E., Kamat, A. M., Kiemeney, L., Lawrentschuk, N., Lerner, S. P., Meeks, J. J., Moch, H., Necchi, A., Panebianco, V., Sridhar, S. S., Znaor, A., Catto, J. W. F., & Cumberbatch, M. G. (2023). Epidemiology of Bladder Cancer in 2023: A Systematic Review of Risk Factors. *European urology*, *84*(2), 176–190. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2023.03.029

[7] Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 10.1002/ijc.33588. Advance online publication. https://doi.org/10.1002/ijc.33588

[8] https://www.comisioncancer.org.uy/categoria/Registro-Nacional-de-Cancer-14

[9]https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Estadisticas-por-DEPARTAMENTOS-uc344

[10] Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: a cancer journal for clinicians*, *74*(1), 12–49. https://doi.org/10.3322/caac.21820

[11] Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: a cancer journal for clinicians*, *74*(1), 12–49. https://doi.org/10.3322/caac.21820

[12] Mohanty, S. K., Lobo, A., Mishra, S. K., & Cheng, L. (2023). Precision Medicine in Bladder Cancer: Present Challenges and Future Directions. *Journal of personalized medicine*, *13*(5), 756. https://doi.org/10.3390/jpm13050756

[13] Flaig, T. W., Spiess, P. E., Abern, M., Agarwal, N., Bangs, R., Boorjian, S. A., Buyyounouski, M. K., Chan, K., Chang, S., Friedlander, T., Greenberg, R. E., Guru, K. A., Herr, H. W., Hoffman-Censits, J., Kishan, A., Kundu, S., Lele, S. M., Mamtani, R., Margulis, V., Mian, O. Y., … Gurski, L. A. (2022). NCCN Guidelines® Insights: Bladder Cancer, Version 2.2022. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, *20*(8), 866–878. https://doi.org/10.6004/jnccn.2022.0041

[14] Lopez-Beltran, A., Cimadamore, A., Montironi, R., & Cheng, L. (2021). Molecular pathology of urothelial carcinoma. *Human pathology*, *113*, 67–83. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2021.04.001

[15] Blanca, A.; Lopez-Beltran, A.; Lopez-Porcheron, K.; Gomez-Gomez, E.; Cimadamore, A.; Bilé-Silva, A.; Gogna, R.; Montironi, R.; Cheng, L. Risk Classification of Bladder Cancer by Gene Expression and Molecular Subtype. *Cancers* **2023**, *15*, 2149. https://doi.org/10.3390/cancers15072149

[16] Tran, L., Xiao, J. F., Agarwal, N., Duex, J. E., & Theodorescu, D. (2021). Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nature reviews. Cancer*, *21*(2), 104–121. https://doi.org/10.1038/s41568-020-00313-1

[17] Jakus, D., Šolić, I., Jurić, I., Borovac, J. A., & Šitum, M. (2023). The Impact of the Initial Clinical Presentation of Bladder Cancer on Histopathological and Morphological Tumor Characteristics. *Journal of clinical medicine*, *12*(13), 4259. https://doi.org/10.3390/jcm12134259

[18] Dobruch, J.; Oszczudłowski, M. Bladder Cancer: Current Challenges and Future Directions. *Medicina* **2021**, *57*, 749. https://doi.org/10.3390/medicina57080749

[19] DeGeorge, K. C., Holt, H. R., & Hodges, S. C. (2017). Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *American family physician*, *96*(8), 507–514.

[20] Powles, T., Bellmunt, J., Comperat, E., De Santis, M., Huddart, R., Loriot, Y., Necchi, A., Valderrama, B. P., Ravaud, A., Shariat, S. F., Szabados, B., van der Heijden, M. S., Gillessen, S., & ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org (2022). Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the*

European Society for Medical Oncology, *33*(3), 244–258. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.11.012

[21] Kamat, A. M., Hahn, N. M., Efstathiou, J. A., Lerner, S. P., Malmström, P. U., Choi, W., Guo, C. C., Lotan, Y., & Kassouf, W. (2016). Bladder cancer. *Lancet (London, England)*, *388*(10061), 2796–2810. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30512-8

[22] Flaig, T. W., Spiess, P. E., Abern, M., Agarwal, N., Bangs, R., Boorjian, S. A., Buyyounouski, M. K., Chan, K., Chang, S., Friedlander, T., Greenberg, R. E., Guru, K. A., Herr, H. W., Hoffman-Censits, J., Kishan, A., Kundu, S., Lele, S. M., Mamtani, R., Margulis, V., Mian, O. Y., … Gurski, L. A. (2022). NCCN Guidelines® Insights: Bladder Cancer, Version 2.2022. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, *20*(8), 866–878. https://doi.org/10.6004/jnccn.2022.0041

[23] Chang, S. S., Boorjian, S. A., Chou, R., Clark, P. E., Daneshmand, S., Konety, B. R., Pruthi, R., Quale, D. Z., Ritch, C. R., Seigne, J. D., Skinner, E. C., Smith, N. D., & McKiernan, J. M. (2016). Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *The Journal of urology*, *196*(4), 1021–1029. https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.06.049

[24] J., Gu, X., Li, Y., & Wu, Q. (2020). Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *129*, 110393. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110393

[25] Bree, K. K., Brooks, N. A., & Kamat, A. M. (2021). Current Therapy and Emerging Intravesical Agents to Treat Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*, *35*(3), 513–529. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.02.003

[26] Relouw, S.; Dugbartey, G.J.; Sener, A. Non-Invasive Imaging Modalities in Intravesical Murine Models of Bladder Cancer. *Cancers* **2023**, *15*, 2381. https://doi.org/10.3390/cancers15082381

[27] Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. A., Burger, M., Alemozaffar, M., Nielsen, M. E., & Lotan, Y. (2017). Bladder cancer. *Nature reviews. Disease primers*, *3*, 17022. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.22

[28]https://www.mayoclinic.org/es/tests-procedures/neobladder-reconstruction/about/pac-20385066

[29] DeGeorge, K. C., Holt, H. R., & Hodges, S. C. (2017). Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *American family physician*, *96*(8), 507–514.

[30] Huang, Z., Fu, J., & Zhang, Y. (2017). Nitric Oxide Donor-Based Cancer Therapy: Advances and Prospects. *Journal of medicinal chemistry*, *60*(18), 7617–7635. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01672

[31] Jansson, O. T., Morcos, E., Brundin, L., Lundberg, J. O., Adolfsson, J., Söderhäll, M., & Wiklund, N. P. (1998). The role of nitric oxide in bacillus Calmette-Guérin mediated anti-tumour effects in human bladder cancer. *British journal of cancer*, *78*(5), 588–592. https://doi.org/10.1038/bjc.1998.545

[32] Sahu, D., Huan, J., Wang, H., Sahoo, D., Casteel, D. E., Klemke, R. L., Boss, G. R., & Hansel, D. E. (2021). Bladder Cancer Invasion Is Mediated by Mammalian Target of Rapamycin Complex 2-Driven Regulation of Nitric Oxide and Invadopodia Formation. *The American journal of pathology*, *191*(12), 2203–2218. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.08.002

[33] Varela, M.; López, M.; Ingold, M.; Alem, D.; Perini, V.; Perelmuter, K.; Bollati-Fogolín, M.; López, G.V.; Hernández, P. New Nitric Oxide-Releasing Compounds as Promising Anti-Bladder Cancer Drugs. *Biomedicines* **2023**, *11*, 199. https://doi.org/10.3390/biomedicines11010199

[34]https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/angiogenesis-inhibitors-fact-sheet#:~:text=Angiogenesis%20is%20the%20formation%20of,chemical%20signals%20in%20the%20body.

[35] Seabra, A. B., & Durán, N. (2018). Nitric oxide donors for prostate and bladder cancers: Current state and challenges. *European journal of pharmacology*, *826*, 158–168. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.02.040

[36] Bogdan C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in immunology*, *36*(3), 161–178. https://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003

[37] MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. Annual Review of Immunology, 15(1), 323-350. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323

[38] Fan, J., Gao, Z., Zhao, D. P., Wang, P., Wu, Z. Z., & Li, X. M. (2019). Effects of nitric oxide donor N,N'-di-sec-butyl-N,N'-dinitroso-1,4-phenylenediamine on the expression of interferon-gamma in tumor infiltrating lymphocytes. *Medical gas research*, *9*(4), 171–175. https://doi.org/10.4103/2045-9912.273954

[39] Mintz, J., Vedenko, A., Rosete, O., Shah, K., Goldstein, G., Hare, J. M., Ramasamy, R., & Arora, H. (2021). Current Advances of Nitric Oxide in Cancer and Anticancer Therapeutics. *Vaccines*, *9*(2), 94. https://doi.org/10.3390/vaccines9020094

[40] Liu, T., Zhang, L., Joo, D. *et al.* NF-κB signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2, 17023 (2017). https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23

[41] Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2012). NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development*, *26*(3), 203–234. https://doi.org/10.1101/gad.183434.111

[42] Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*, *27*, 693–733. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641

[43] Guo, Q., Jin, Y., Chen, X. et al. NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. Sig Transduct Target Ther 9, 53 (2024). https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9

[44] Liu, C. P., Zhang, X., Tan, Q. L., Xu, W. X., Zhou, C. Y., Luo, M., Li, X., Huang, R. Y., & Zeng, X. (2017). NF-κB pathways are involved in M1 polarization of RAW 264.7 macrophage by polyporus polysaccharide in the tumor microenvironment. *PloS one*, *12*(11), e0188317. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188317

[45] Huangfu, L., Li, R., Huang, Y. et al. The IL-17 family in diseases: from bench to bedside. Sig Transduct Target Ther 8, 402 (2023). https://doi.org/10.1038/s41392-023-01620-3

[46] Wu, W., Chen, L., Jia, G., Tang, Q., Han, B., Xia, S., Jiang, Q., & Liu, H. (2023). Inhibition of FGFR3 upregulates MHC-I and PD-L1 via TLR3/NF-kB pathway in muscle-invasive bladder cancer. *Cancer medicine*, *12*(14), 15676–15690. https://doi.org/10.1002/cam4.6172

[47] Shah, G., Zhang, G., Chen, F., Cao, Y., Kalyanaraman, B., & See, W. A. (2014). iNOS expression and NO production contribute to the direct effects of BCG on urothelial carcinoma cell biology. *Urologic oncology*, *32*(1), 45.e1–45.e459. https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.06.005

[48] Xiao, J., Gong, L., Xiao, M., He, D., Xiang, L., Wang, Z., Cheng, Y., Deng, L., & Cao, K. (2021). LINC00467 Promotes Tumor Progression *via* Regulation of the NF-kb Signal Axis in Bladder Cancer. *Frontiers in oncology*, *11*, 652206. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.652206

[49] Benjamin Bonavida. Sensitizing activities of nitric oxide donors for cancer resistance to anticancer therapeutic drugs. Biochemical Pharmacology, Volume 176, 2020, 113913, ISSN 0006-2952, https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113913.

[50] Sawicka, E., Lisowska, A., Kowal, P., & Długosz, A. (2015). Rola stresu oksydacyjnego w raku pęcherza moczowego [The role of oxidative stress in bladder cancer]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, *69*, 744–752. https://doi.org/10.5604/17322693.1160361

[51] Xi, X. J., Chen, S. H., & Mi, H. (2020). Aldh2 gene reduces oxidative stress in the bladder by regulating the NF-κB pathway in a mouse model of ketamine-induced cystitis. Experimental and therapeutic medicine, 20(5), 111. https://doi.org/10.3892/etm.2020.9239

[52] Jeon, C., Kim, M., Kwak, C., Kim, H. H., & Ku, J. H. (2013). Prognostic role of survivin in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. PloS one, 8(10), e76719. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076719

[53] Stec, R., Cierniak, S., Lubas, A., Brzóskowska, U., Syryło, T., Zieliński, H., & Semeniuk-Wojtaś, A. (2020). Intensity of Nuclear Staining for Ki-67, p53 and Survivin as a New Prognostic Factor in Non-muscle Invasive Bladder Cancer. Pathology oncology research: POR, 26(2), 1211–1219. https://doi.org/10.1007/s12253-019-00678-1

[54] Tan, S., Fu, L., & Dong, Q. (2021). AATF is Overexpressed in Human Bladder Cancer and Regulates Chemo-Sensitivity Through Survivin. OncoTargets and therapy, 14, 5493–5505. https://doi.org/10.2147/OTT.S319734

[55] Yahyazadeh, R., Bashash, D., Ghaffari, P., Kord, S., Safaroghli-Azar, A., & Ghaffari, S. H. (2021). Evaluation of hTERT, KRT7, and survivin in urine for noninvasive detection of bladder cancer using real-time PCR. BMC urology, 21(1), 64. https://doi.org/10.1186/s12894-021-00838-z

[56] Santha, S., Ling, X., Aljahdali, I. A. M., Rasam, S. S., Wang, X., Liao, J., Wang, J., Fountzilas, C., Li, Q., Qu, J., & Li, F. (2020). Mutant Kras as a Biomarker Plays a Favorable Role in FL118-Induced Apoptosis, Reactive Oxygen Species (ROS) Production and Modulation of Survivin, Mcl-1 and XIAP in Human Bladder Cancer. Cancers, 12(11), 3413. https://doi.org/10.3390/cancers12113413

[57] Ecke, T. H., Kiani, A., Schlomm, T., Friedersdorff, F., Rabien, A., Jung, K., Kilic, E., Boström, P., Tervahartiala, M., Taimen, P., Gleichenhagen, J., Johnen, G., Brüning, T., Koch, S., Roggisch, J., & Wirtz, R. M. (2020). Prognostic Role of Survivin and Macrophage Infiltration Quantified on Protein and mRNA Level in Molecular Subtypes

Determined by RT-qPCR of KRT5, KRT20, and ERBB2 in Muscle-Invasive Bladder Cancer Treated by Adjuvant Chemotherapy. International journal of molecular sciences, 21(19), 7420. https://doi.org/10.3390/ijms21197420

[58] Cui, X., Shen, D., Kong, C., Zhang, Z., Zeng, Y., Lin, X., & Liu, X. (2017). NF-κB suppresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating survivin expression in vitro and in vivo. Scientific reports, 7, 40723. https://doi.org/10.1038/srep40723

[59] Sally P. Wheatley, Dario C. Altieri; Survivin at a glance. J Cell Sci 1 April 2019; 132 (7): jcs223826. doi: https://doi.org/10.1242/jcs.223826

[60] Dunajová, L., Cash, E., Markus, R., Rochette, S., Townley, A. R., & Wheatley, S. P. (2016). The N-terminus of survivin is a mitochondrial-targeting sequence and Src regulator. Journal of cell science, 129(14), 2707–2712. https://doi.org/10.1242/jcs.183277

[61] Garg, H., Suri, P., Gupta, J. C., Talwar, G. P., & Dubey, S. (2016). Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer cell international*, *16*, 49. https://doi.org/10.1186/s12935-016-0326-1

[62] Zhang, R., McIntyre, P. J., Collins, P. M., Foley, D. J., Arter, C., von Delft, F., Bayliss, R., Warriner, S., & Nelson, A. (2019). Construction of a Shape-Diverse Fragment Set: Design, Synthesis and Screen against Aurora-A Kinase. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), 25(27), 6831–6839. https://doi.org/10.1002/chem.201900815

[63] Wang, T., Zhang, Y. H., Kong, X. W., Lai, Y. S., Ji, H., Chen, Y. P., & Peng, S. X. (2009). Synthesis and biological evaluation of nitric oxide-donating thalidomide analogues as anticancer agents. Chemistry & biodiversity, 6(4), 466–474. https://doi.org/10.1002/cbdv.200800014

[64] SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci. Rep. (2017) 7:42717. (http://www.swissadme.ch/)

[65] Griess, P. Bemerkungen Zu Der Abhandlung Der HH. Weselsky und Benedikt" Ueber Einige Azoverbindungen". Ber. Der Dtsch. Química. Ges. 1879, 12, 426–428.

[66] Sodano, F.; Gazzano, E.; Rolando, B.; Marini, E.; Lazzarato, L.; Fruttero, R.; Riganti, C.; Gasco, A. Tuning NO release of organelle-targeted furoxan derivatives and their cytotoxicity against lung cancer cells. Bioorg. Chem. 2021, 111, 104911.

[67] Bubenik J, Baresova M Viklicky V, Jakoubkova J, Sainerova H, Donner J. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. Int. J. Cancer. 1973; 11: 765 - 773.

[68] Elliott AY Cleveland PH, Cervenka J, Castro AE, Stein N, Hakala TR, Fraley EE. Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract. J. Natl. Cancer Inst. 1974; 53:1341-1349.

[69] Skowron, M.A.; Melnikova, M.; Van Roermund, J.G.H.; Romano, A.; Albers, P.; Thomale, J.; Schulz, W.A.; Niegisch, G.; Hoffmann, M.J. Multifaceted Mechanisms of Cisplatin Resistance in Long-Term Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 590. https://doi.org/10.3390/ijms19020590

[70] T.J. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, Immunol. Methods. 65 (1983) 55–63.

[71] Gunawan Indrayanto, Galih Satrio Putra, Farida Suhud, Chapter Six - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Academic Press, Volume 46, 2021, Pages 273-307, ISSN 1871-5125, ISBN 9780128241271, https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2020.07.005.

[72] Chou TC and Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors.Adv Enzyme Regul 1984; 22: 27.

[73] Møller P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 98(4), 336–345. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_167.x

[74] Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D., Bankoglu, E. E., Bonassi, S., Boutet-Robinet, E., Brunborg, G., Chao, C., Cooke, M. S., Costa, C., Costa, S., Dhawan, A., de Lapuente, J., Bo', C. D., Dubus, J., Dusinska, M., Duthie, S. J., … Azqueta, A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. Nature protocols, 18(3), 929–989. https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y

[75] Anderson, D.; Yu, T.W.; Phillips, B.J.; Schmezer, P. The Effect of Various Antioxidants and Other Modifying Agents on Oxygen-Radical-Generated DNA Damage in Human Lymphocytes in the COMET Assay. Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 1994, 307, 261–271.

[76] Collins, A.R.; Ai-guo, M.; Duthie, S.J. The Kinetics of Repair of Oxidative DNA Damage (Strand Breaks and Oxidised Pyrimidines) in Human Cells. Mutat. Res. Repair 1995, 336, 69–77.

[77] Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc. 2007;2(2):329-333. doi:10.1038/nprot.2007.30

[78] Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. Nat. Methods 2012, 9, 671–675

[79] Yang, Y., Liu, K., Yang, L., & Zhang, G. (2018). Bladder cancer cell viability inhibition and apoptosis induction by baicalein through targeting the expression of anti-apoptotic genes. Saudi journal of biological sciences, 25(7), 1478–1482. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.03.014

[80] OECD (2020), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071247-en.

[81] Hori S, Miyake M, Tatsumi Y, Onishi S, Morizawa Y, Nakai Y, et al. (2017) Topical and systemic immunoreaction triggered by intravesical chemotherapy in an N-butyl-N-(4- hydroxybutyl) nitrosamine induced bladder cancer mouse model. PLoS ONE 12(4): e0175494.

[82] Vasconcelos-Nóbrega, C., Colaço, A., Lopes, C., & Oliveira, P. A. (2012). Review: BBN as an urothelial carcinogen. In vivo (Athens, Greece), 26(4), 727–739.

[83] Dobek, G. L., Godbey, W. T. (2011). An Orthotopic Model of Murine Bladder Cancer. J. Vis. Exp. (48), e2535, doi:10.3791/2535.

[84] Oliveira, P. A., Palmeira, C., Colaço, A., de la Cruz, L. F., & Lopes, C. (2006). DNA content analysis, expression of Ki-67 and p53 in rat urothelial lesions induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine and treated with mitomycin C and bacillus Calmette-Guérin. Anticancer research, 26(4B), 2995–3004.

[85] Chankeshwara, S. V., & Chakraborti, A. K. (2006). Catalyst-free chemoselective N-tert-butyloxycarbonylation of amines in water. Organic letters, 8(15), 3259–3262. https://doi.org/10.1021/ol0611191

[86] Sorba, G., Medana, C., Fruttero, R., Cena, C., Di Stilo, A., Galli, U., & Gasco, A. (1997). Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. Journal of medicinal chemistry, 40(4), 463–469. https://doi.org/10.1021/jm960379t

[87] Maruyama T, Yamamoto S, Qiu J, Ueda Y, Suzuki T, Nojima M, Shima H. Apoptosis of bladder cancer by sodium butyrate and cisplatin. J Infect Chemother. 2012 Jun;18(3):288-95. doi: 10.1007/s10156-011-0322-2. Epub 2011 Oct 26. PMID: 22041988.

[88] Pan, C. W., Shen, Z. J., Wu, T. T., Tang, X. Y., Wang, M., Sun, J., & Shao, Y. (2009). Cell adhesion to fibronectin induces mitomycin C resistance in bladder cancer cells. BJU international, 104(11), 1774–1779. https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08639.x

[89] Morris EJ, Keramaris E, Rideout HJ, Slack RS, Dyson NJ, Stefanis L, Park DS. Cyclin-dependent kinases and P53 pathways are activated independently and mediate Bax activation in neurons after DNA damage. J Neurosci. 2001 Jul 15;21(14):5017-26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-14-05017.2001. PMID: 11438577; PMCID: PMC6762857.

[90] Reisinger, A. J., Tannehill-Gregg, S. H., Waites, C. R., Dominick, M. A., Schilling, B. E., & Jackson, T. A. (2009). Dietary ammonium chloride for the acidification of mouse urine. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS, 48(2), 144–146.

[91] Böswald, L. F., Matzek, D., Kienzle, E., & Popper, B. (2021). Influence of Strain and Diet on Urinary pH in Laboratory Mice. Animals: an open access journal from MDPI, 11(3), 702. https://doi.org/10.3390/ani11030702

[92] Gabrielle E. Kennelley, Jordan J. McDonald, Norbert Sule, Barbara A. Foster, Craig M. Brackett, Wendy J. Huss. Sex disparities in a murine model of BBN-induced bladder cancer [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2023; Part 1 (Regular and Invited Abstracts); 2023 Apr 14-19; Orlando, FL. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2023;83(7_Suppl):Abstract nr 17.

[93] Degoricija, M., Korac-Prlic, J., Vilovic, K. et al. The dynamics of the inflammatory response during BBN-induced bladder carcinogenesis in mice. J Transl Med 17, 394 (2019). https://doi.org/10.1186/s12967-019-02146-5