

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**RECEPTORES Y VÍAS DE  
SEÑALIZACIÓN DE VIP COMO  
DIANAS TERAPÉUTICAS EN EL  
CÁNCER RENAL**

**TESIS DOCTORAL**

**Eva Vacas Oliva**

**2012**





**Universidad  
de Alcalá**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Facultad de Medicina

Campus Universitario

28871 Alcalá de Henares

Teléfono: 91 885 45 13 Fax: 91 885 45 85

**JUAN CARLOS PRIETO VILLAPÚN y MARÍA JOSÉ CARMENA SIERRA,**  
Catedráticos del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la  
Universidad de Alcalá,

INFORMAN:

Que el trabajo presentado por **Eva Vacas Oliva**, titulado **“RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE VIP COMO DIANA TERAPÉUTICA EN EL CÁNCER RENAL”** ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá bajo su dirección, y a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que la interesada opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, 21 de Mayo de 2012

Dr. Juan Carlos Prieto

Dra. M<sup>a</sup> José Carmena





**Universidad  
de Alcalá**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Facultad de Medicina

Campus Universitario

28871 Alcalá de Henares

Teléfono: 91 885 45 13 Fax: 91 885 45 85

**MARÍA JOSÉ CARMENA SIERRA**, como Directora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que la tesis doctoral que lleva como título **“RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE VIP COMO DIANA TERAPÉUTICA EN EL CÁNCER RENAL”** ha sido realizada por Eva Vacas Oliva en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá, bajo la dirección de JUAN CARLOS PRIETO VILLAPÚN y MARÍA JOSÉ CARMENA SIERRA, y a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que la interesada opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, 21 de Mayo de 2012

Dra. M<sup>a</sup> José Carmena



*“Cada día sabemos más y entendemos menos”*

*Albert Einstein*

*“En cuestiones de cultura y de saber, sólo se pierde lo que se guarda;*

*sólo se gana lo que se da”*

*Antonio Machado*



*A mi familia*

*A Raúl*



Son muchas las personas que me han ayudado y apoyado durante esta etapa y por supuesto, en este trabajo, también hay un sitio para todos ellos.

*Juan Carlos*, recuerdo el día que vine a hablar contigo para aprender a trabajar en un laboratorio, parece que fue ayer y ya han pasado más de 4 años. Muchísimas gracias por acogerme, enseñarme, por tu apoyo y comprensión, y por darme la oportunidad de formar parte de este grupo que para mí ha sido tan especial.

*M<sup>a</sup> José*, que puedo decirte además de gracias por estar ahí, por enseñarme, por dedicarme todo tu tiempo, por escucharme y ayudarme siempre y sobretodo porque sin tu experiencia, sabiduría y capacidad de organización esto no habría sido posible. De todo corazón, gracias.

*Ana Bajo*, muchas gracias por ayudarme en este largo camino. Gracias por estar ahí en mis momentos de desilusión y conseguir que no perdiera la esperanza.

*Anuska*, mi alma gemela, tú mejor que nadie sabes el esfuerzo que hay detrás de estas hojas. No encuentro palabras para agradecer tu apoyo incondicional, tu complicidad, las ganas de trabajar y luchar que siempre me transmites, sólo puedo decirte muchísimas gracias por ser como eres y por hacerme siempre tan feliz. Espero que se cumplan todos tus sueños, te lo mereces. *Valdehita*, muchas gracias por enseñarme con tanta paciencia y por los momentos tan buenos que hemos pasado, ojalá podamos volver a coincidir en un futuro. *Sandra*, muchas gracias por ayudarme cuando lo he necesitado, te deseo mucha suerte. *Adri* y *Sandra Alonso*, me llevo muy buenos recuerdos de vosotras, lástima que no duraran más tiempo.

*Laura*, mi niña, mi compañera en las dichas y desdichas, muchas gracias por estar a mi lado siempre, por escucharme, ayudarme y apoyarme haciendo del día a día una bonita rutina. Aún te queda un largo camino que recorrer, disfrútalo. *Ester*, paciencia que seguro que lo consigues, mucha suerte.

Agradecer a mis compañeros del departamento, a los becarios del laboratorio del Dr. Arilla, *Alberto* y a especialmente a *Arantxa*, ten paciencia que ya te queda muy poquito. Al laboratorio del Dr. Pérez-Albarsanz, Luis y Yurena, os deseo lo mejor. Al laboratorio del Dr. Guijarro, a los que ya no están *Vero, Sandra* y *Eva*, a los que les queda muy poquito, mucha suerte *Borja*. A las "Laviadas" *Nuria, Cecilia* y a ante todo a *Diana*, mucha suerte en tu camino cariño y, sobretodo, gracias por ayudarme a elegir mi destino. A los del laboratorio de la Dr. Boyano, *Irene Cris* y *Elia*; del laboratorio del Dr. Díez, *Virginia*. Agradecer además a los becarios de los laboratorios del Dr. Chiloeches-Roperero-Colás-Jiménez, *Pablo, Nadia, Ana, Carlos Mario, Ariel, Mali, Raúl*.... por recibirme siempre con una sonrisa y ayudarme cuando habéis tenido ocasión.

Quisiera hacer una mención especial a *Javier Lucio*, por permitirme ser casi una hija adoptiva en tu laboratorio, gracias por saber escuchar, te deseo lo mejor porque tu esfuerzo y constancia lo merecen. Gracias a *M<sup>a</sup> Bel Arenas* por su inestimable ayuda, y desearles suerte a las nuevas incorporaciones, *Jorge* y *Toño*.

Me gustaría agradecer su apoyo a los técnicos *Miguel* y *Luis* porque me habeis ayudado muchísimo, a *Angélica* por tu ayuda con todos los papeles, gracias por solucionármelo todo. A *Isabel*, gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado y a todas las becarias de cultivos, en especial a *Lourdes*, donde sé que tengo una amiga. A *Juan* y a *Guillermo*. A Luisa y Esther, por limpiar muy bien y tomarse con mucho humor todos los destrozos que hemos sufrido en el laboratorio.

Agradecer también a todos los profesores del departamento que siempre están ahí cuando lo necesitas, y en especial a Eduardo por "abrir" el pasillo por las mañanas y a Miguel Ángel, siempre consigues alegrarnos el día y pillarnos si hacemos alguna trastada.

Mis familiares y amigos que siempre me han apoyado también merecen una mención especial.

Muchas gracias a Sara, Angel, Raquel, Pedro, Alberto, Felipe, Bea, Pilar, Erika, Maite, Esther, Sonia ... a mis primos, mis tíos, mi familia "política", y a todos aquellos que siempre me habéis apoyado.

A **Raúl**, gracias mi vida por hacerme tan feliz, por estar ahí siempre sobretodo en estos momentos tan difíciles, por intentar comprender mis experimentos y por tus ganas de ayudarme. Te quiero muchísimo mi amor, muchas gracias por todo.

Una dedicación especial a mis **padres** y mi hermano **Víctor**, porque siempre me habéis comprendido, escuchado y ayudado, pero sobretodo a ti mama por tu enorme paciencia conmigo, gracias por esos desayunos en los que conseguías que todas mis preocupaciones fueran minúsculas. Muchas gracias **papá y mamá** porque todos vuestros esfuerzos para que yo consiguiera todo lo que me proponía están dando su fruto.



# **Abreviaturas**





---

AC: Adenilato ciclasa	DRAM: Modulador de autofagia
ABTS: 2,2'-acínobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)	regulador del daño
AMPc: Adenosin monofosfato cíclico	DBD. Dominio de unión al DNA.
AMPK: Quinasa activada por AMP	DEPC: Dietilpirocarbonato
AJ: Uniones adherentes.	DMSO: Dimetilsulfoxido
AP-1/2: Proteína activadora -1/2	dNTPs: desoxirribonucleotidos trifosfato
AR: Anfiregulina	DTT: Ditiotreitól
ARF: Factor de ribosilación de ADP	EGF: Factor de crecimiento epidérmico
ARNi: ARN de interferencia	EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
ATP: Adenosina trifosfato	EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
BAF: Factor de activación de células B	EGTA: Ácido etilenglicoltetracético
BAX: Proteína X asociada a BCL2	ELISA: Inmunoanálisis ligado a enzima
BCL2: Proteína del linfoma de células B 2	EPACs: Proteínas de intercambio activadas por AMPc
BDPE: Benzo- $\alpha$ -piren-diol epóxido	ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares
BrdU: Bromodeoxiuridina	FAK: Quinasa de adhesión focal
BSA: Albumina sérica bovina	FBS: Suero fetal bovino
CBD: Dominio de unión a celulasas bacterianas	FDA: "Food and Drug Administration"
CBP: Proteína de enlace a CREB	FITC: Isotiocianato de fluoresceína
CCR: Carcinoma de células renales	FPRL1: Receptor similar al de péptidos formilados 1
ccCCR: CCR de células claras	Fsk: Forskolina
CDK. Quinasas dependientes de ciclinas	Fz: "Frizzled"
CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística	GABA: ácido gamma aminobutírico
CM-H2DCFDA: clorometil-2',7'-diclorofluoresceína	GDP: Guanosina difosfato
CRE: Elemento de respuesta a AMPc	GEF: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
CREB: Proteína de unión a CRE	GHRH: Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
COX: Ciclooxygenasa	GIP: Péptido inhibidor gástrico
CXCR4: Receptores de quimioquinas CX	
DAG: Diacilglicerol	

GLP: Péptido similar al glucagón	MEK: Quinasas de MAPK
GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G	MMPs: Metaloproteasas de matriz
GPX: Glutation peroxidasa	MT-MMP: Metaloproteasas de la membrana
GSK-3 $\beta$ : Quinasa glicogeno sintasa 3 beta	MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol
GTP: Guanosina trifosfato	mTOR: Diana de la rapamicina en mamíferos
HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2	MUC4: Mucina 4
HER2-P: HER2 fosforilado	NAD: Dominio de autorregulación negativa
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos	NF $\kappa$ B: Factor de transcripción nuclear kappa B
HIF: Factor inductor de hipoxia	NLS. Secuencias de localización nuclear
HRG: Heregulinas/Heregulin	NRP-1/2: Neuropilina-1/2
HRP: Peróxidasa de rábano	NTI: nefritis tubulointersticial
HSP: Proteína de shock térmico	OMS: Organización Mundial de la Salud
I $\kappa$ B: Inhibidor de NF $\kappa$ B	PAAF: Punción aspiración con aguja fina
IBMX: Isobutilmetilxantina	PACAP: Péptido activador de la Adenilato ciclasa hipofisaria
IGF: Factor de crecimiento similar a insulina	PAR-1: Receptor tipo 1 activador de proteasas
IKK: Quinasa I $\kappa$ B	PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular
IL: Interleuquina	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
INF: Interferón	PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
IP3: Inositol trifosfato	PDGFR: Receptor de PDGF
IRF: Factor de respuesta inflamatoria	PET: Tomografía por emisión de positrones
JAK: Janus Quinasas	PGE2: Prostaglandina E2
LEF: Factor potenciador linfoide	PHI: Péptido histidina isoleucina
LPA: Ácido lipofosfatídico	PHM: Péptido histidina metionina
LTB: Linfotoxina $\beta$	PHV: Péptido histidina valina
LPS: Lipopolisacárido	PI3K: Fosfoinosítido 3 quinasa
LRA: Lesión renal aguda	
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos	
MAPKK: MAP quinasa quinasa	
MDM2: "Murine doble minute 2"	



---

PIGF: Factor de crecimiento placentario	TAD: Dominio de transactivación
PIP2: Fosfatidilinositol difosfato	TMB: 3,3,5,5'-tetrametilbenzidina
PKA: Proteína quinasa A	TBS: Tampón tris salino
PKB: Proteína quinasa B	TCF: Factor de la célula T
PKC: Proteína quinasa C	T <sup>3</sup> H: Timidina tritiada
PLA: Fosfolipasa A	TD: Dominio de tetramerización
PLC: Fosfolipasa C	TEA: Trietanolamina
PLD: Fosfolipasa D	TESPA: 3-aminopropiltriethoxylane
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	TGF: Factor de crecimiento transformante
PR: Receptor de progesterona	TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteasas
PRC: Proteína reactiva C	TMD: Dominio transmembrana
PTB: Dominio de unión a fosfotirosina	TNF: Factor de necrosis tumoral
PTEN: Homologo de fosfatasa y tensina	TRH: Terapia de remplazo hormonal
RARE: Elementos de respuesta a ácido retinoico	TSE: Elemento específico tisular
Rb: Proteína del retinoblastoma	TSP: Trombospondina
RE-1: Elemento restrictivo 1	UTRs: Regiones no codificantes
RGS: Proteínas G reguladoras de señales	VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular
RHD: Dominio de homología a Rel	VEGFR: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
ROS: Especies reactivas del oxígeno	VIP: Péptido intestinal vasoactivo
RT: Retrotranscripción	VHL: Von Hippel -Lindau
RTKs: Receptores tirosina quinasa	
SDS: Docecilsulfato sódico	
SESN: Sestrinas	
SH2: Dominio 2 de homología a Src	
SNC: Sistema nervioso central	
SNP: Sistema nervioso periférico	
SOD: Superoxido dismutasa	
SP1. Esfingosina 1	
Sp-1: Proteína específica 1	
STAT: Factor transductor de señales y activador de la transcripción	



# Índice





---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. El riñón	3
1.1.1. Estructura	3
1.1.2. Función	4
1.1.3. Patologías del túbulo proximal	5
1.1.3.1. Tubulopatías	5
1.1.3.2. Lesión renal aguda	7
1.1.3.3. Nefritis tubulointersticial	7
1.1.3.4. Carcinoma de células renales	8
1.1.3.4.1. Epidemiología	9
1.1.3.4.2. Etiología	10
1.1.3.4.3. Sistemas de clasificación	12
1.1.3.4.4. Diagnóstico	15
1.1.3.4.5. Tratamiento	16
1.2. Procesos relacionados con el desarrollo tumoral y factores implicados	17
1.2.1. Proliferación	17
1.2.2. Angiogénesis	21
1.2.3. Adhesión	23
1.2.4. Degradación de la MEC	25
1.2.5. Estrés oxidativo	29
1.2.6. Vía NFkB	31
1.2.7. Vía STAT3	35
1.3. Péptido Intestinal Vasoactivo	38
1.3.1. Acciones biológicas de VIP	41
1.3.2. Mecanismos de señalización del VIP	47
1.3.3. Antagonista de VPAC: JV-1-53	52
1.3.4. VIP y riñón	53



<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>59</b>
3.1 Materiales	61
3.1.1 Reactivos	61
3.1.2 Modelos experimentales	64
3.1.2.1 Tejido de riñón humano	64
3.1.2.2 Líneas Celulares	64
3.1.2.3 Animales de experimentación	65
3.2 Métodos	66
3.2.1 Ácidos Nucléicos	66
3.2.1.1 Aislamiento de RNA	66
3.2.1.2 RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCRQ)	67
3.2.1.3 Retrotranscripción (RT)	68
3.2.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	69
3.2.2 Proteínas	70
3.2.2.1 Inmunohistoquímica	70
3.2.2.2 Aislamiento de proteínas totales	71
3.2.2.3 Aislamiento de citosoles y núcleos	71
3.2.2.4 Aislamiento de membranas y núcleos	72
3.2.2.5 ELISA para valorar VIP	73
3.2.2.6 ELISA para valorar VEGF <sub>165</sub>	74
3.2.2.7 Inmunodetección de proteínas	75
3.2.2.8 Inmunocitoquímica	77
3.2.3 Determinación de la actividad adenilato ciclasa	78
3.2.4 Incorporación de timidina	79
3.2.5 Incorporación de BrdU	80
3.2.6 Ensayo de viabilidad con MTT	81
3.2.7 Ensayo de unión de Ioduro de propidio y Anexina V-FITC	81
3.2.8 Análisis del Ciclo Celular	82
3.2.9 Silenciamiento génico del receptor VPAC <sub>1</sub>	82



3.2.10	Medida de la producción de ROS	83
3.2.11	Zimografía de gelatina	84
3.2.12	Ensayos de migración	85
3.2.13	Ensayos de adhesión, migración e invasión	85
3.2.14	Análisis Estadístico	87
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>89</b>
4.1	Estudio del sistema VIP-Receptor en riñón	91
4.1.1	Estudio comparativo del sistema VIP-VPACs/FPRL-1 en tejido humano de riñón tumoral y no tumoral	91
4.1.1.1	Expresión de VIP	92
4.1.1.2	Estudio de los receptores de VIP	94
4.1.2	Estudio del sistema VIP-VPACs/FPRL-1 en células	96
4.1.2.1	Expresión de VIP	96
4.1.2.2	Expresión de los receptores	97
4.1.2.3	Funcionalidad de los receptores de VIP	100
4.1.2.4	Efecto de VIP sobre su propia expresión y la de sus receptores	101
4.2	Implicación de VIP en la activación de factores de transcripción implicados en la oncogénesis	104
4.2.1	Efecto de VIP en la activación de NFkB.	104
4.2.2	Efecto de VIP en la fosforilación de STAT3.	108
4.3	Estudio de la implicación de VIP en el desarrollo de fenotipos de iniciación y progresión tumoral.	110
4.3.1	Efecto de VIP sobre la proliferación celular.	110
4.3.2	Efecto de VIP sobre los niveles de ROS	118
4.3.3	Efecto de VIP sobre la expresión de VEGF <sub>165</sub>	121
4.3.4	Efecto de VIP sobre la adhesión celular	125



---

4.3.5 Efecto de VIP en procesos degradativos de la matriz extracelular	129
4.3.6 Efecto de VIP en procesos migratorios e invasivos	133
4.4 Estudio del efecto de VIP en un modelo in vivo.	138
4.5 Estudio del papel protector de VIP	141
4.5.1 Efecto de VIP sobre el daño generado por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	141
4.5.2 Efecto de VIP sobre el efecto del LPS	159
4.5.3 Regulación del sistema receptor de VIP en condiciones inflamatorias	163
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>169</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>205</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>209</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>213</b>
<b>9. ARTÍCULOS PUBLICADOS</b>	<b>217</b>
<b>10. FINANCIACIÓN</b>	<b>221</b>

# **1. Introducción**





## 1.1 El riñón

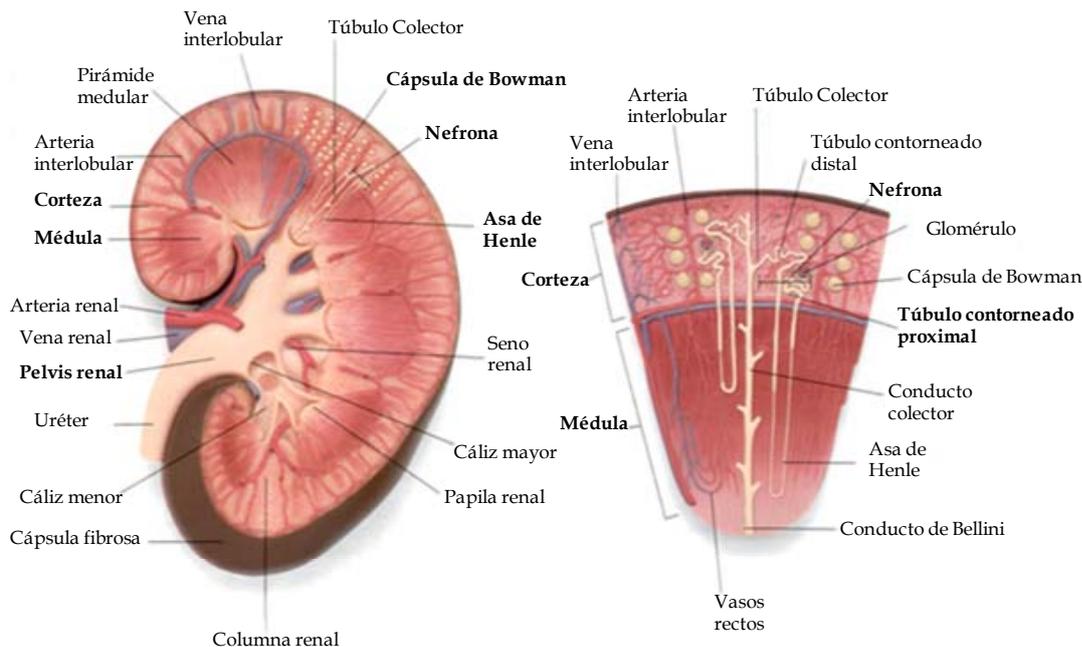
El riñón es un órgano de estructura compleja adaptada a diversas funciones biológicas esenciales. La anatomía renal contiene organizaciones morfológicas altamente diferenciadas como la vascularización y las estructuras responsables del mecanismo de filtración, formación de la orina y regulación de la presión arterial.

### 1.1.1 Estructura

A nivel macroscópico, los riñones constituyen un órgano par, de situación retroperitoneal. Están localizados en la pared abdominal posterior, a ambos lados de la columna vertebral. El peso medio del riñón varía en función del sexo, siendo 130-170 g en el hombre y 115-160 g en la mujer.

Individualmente, el riñón presenta una forma ovoidea irregular. En el extremo superior del uréter se localiza la **pelvis renal**. Es una amplia estructura con forma de embudo, donde finalmente desembocan los **cálices**, encargados de drenar la mitad superior e inferior del riñón. En el borde interno de cada riñón, se observa una hendidura longitudinal denominada hilio renal. Éste conduce a una cavidad donde se encuentran los vasos renales, cálices y parte de la pelvis, todo ello rodeado de tejido adiposo, denominada **seno renal**.

En el corte de un riñón hemiseccionado (Fig. 1) se aprecian dos zonas fácilmente distinguibles a simple vista: una externa o **corteza**, de coloración rojo-pardusca, y una interna o **médula**, más pálida. La corteza renal contiene los glomérulos, los túbulos contorneados de la nefrona y los vasos sanguíneos (Fig. 1). En la médula se localizan unas masas cónicas de color claro denominadas pirámides renales. Cada pirámide, con su extremo externo cubierto por corteza, constituye un lóbulo renal.



**Figura 1:** Esquema de un corte sagital del riñón, pelvis renal y vasos aferentes (Izquierda). Esquema de la nefrona (Derecha).

### 1.1.2 Función

El riñón posee una estructura extremadamente compleja y característica, que le permite realizar numerosas funciones:

1. Regulación del volumen y la osmolaridad de los líquidos corporales mediante el control del equilibrio electrolítico e hídrico.
2. Excreción de los productos de desecho producidos por el metabolismo celular y de las sustancias químicas extrañas al organismo.
3. Regulación de la presión arterial, entre otros mecanismos mediante la secreción de factores vasoactivos como la renina, implicada en la formación de la angiotensina II.
4. Regulación del equilibrio ácido-base, principalmente mediante la excreción de ácidos.
5. Regulación de la eritropoyesis, mediante la secreción de eritropoyetina.



6. Regulación de la vitamina D<sub>3</sub>, dando lugar a su forma más activa, la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, que participa en el metabolismo del calcio y del fósforo.
7. Gluconeogénesis, sintetizando glucosa a partir de aminoácidos y otros precursores en situaciones de ayuno prolongado.

### 1.1.3 Patologías del túbulo proximal

La diversidad de estructuras que presenta el riñón hacen que exista un inmenso abanico de patologías renales. En este apartado se hace un breve resumen de las enfermedades que afectan principalmente a las células tubulares.

Las células del túbulo proximal son las más sensibles a las sustancias tóxicas de la sangre debido a la intensa exposición a la que se ven sometidas. Esto se debe a que, durante el proceso de filtración glomerular, entran pequeñas moléculas tóxicas a los túbulos capaces de activar diferentes sistemas enzimáticos, incrementando así su vulnerabilidad.

#### 1.3.1.1 Tubulopatías

Las enfermedades tubulares renales o **tubulopatías** se definen como alteraciones clínicas en las que existe una disfunción tubular específica, con escasa o nula afectación de la función glomerular. Esta definición sólo es válida en los estadios precoces, ya que durante su evolución también se puede generar una patología glomerular secundaria.

Las disfunciones tubulares pueden ser simples o complejas, según afecten al transporte tubular de una o varias sustancias, respectivamente. Si únicamente se produce alteración en el transporte tubular, se consideran tubulopatías primitivas, mientras que las secundarias surgen en el curso de otras enfermedades o son la consecuencia de la administración de

medicamentos o **tóxicos** (Hernando y col., 2008). En la tabla 1 se muestran enfermedades que afectan al túbulo renal (Laso, 2004).

**Tabla 1.** Clasificación de las enfermedades tubulares renales

<b>Trastornos del transporte de proteínas</b>	Proteinuria tubular
<b>Trastornos del transporte de glucosa</b>	Glucosuria renal hereditaria
<b>Trastornos del transporte de ácido úrico</b>	Hipouricemia renal hereditaria
<b>Trastornos del transporte de fosfato</b>	Hipofosfatemia familiar ligada al sexo o con herencia autosómica; pseudoparatiroidismo
<b>Trastornos del transporte de aminoácidos</b>	Cistinuria; hipercistinuria aislada; hiperaminoaciduria dibásica; enfermedad de Hartnup; malabsorción de metionina; histidinuria; aminoglicinuria familiar; aminoacidurias
<b>Trastornos múltiples del túbulo proximal</b>	Síndrome de Fanconi idiopático secundario
<b>Trastornos de la función reguladora del equilibrio ácido-base</b>	Acidosis tubular renal
<b>Trastornos del transporte de calcio</b>	Hiper calciuria de origen renal
<b>Trastornos del transporte de sodio, potasio y magnesio</b>	Pseudohipoaldosteronismo; síndrome de Bartter; síndrome de Gitelman; síndrome de Liddle; exceso aparente de mineralocorticoides; hipomagnesemia
<b>Trastornos del transporte de agua</b>	Diabetes insípida nefrogénica hereditaria



### 1.3.1.2 Lesión renal aguda

El término lesión renal aguda (LRA) cada vez es más utilizado como sinónimo de necrosis tubular aguda (NTA) o lesión tubular aguda. Es una patología que se caracteriza por la disminución de la función renal y, a menudo, por evidencias morfológicas de lesión tubular.

La LRA es responsable del 50% de los casos de insuficiencia renal aguda en pacientes hospitalizados. Se trata de una lesión renal que puede ser **reversible**, asociada a varias situaciones clínicas como isquemia y/o nefrotoxicidad. Además de su frecuencia, la posible reversibilidad de la LRA aumenta su importancia clínica. Así, el tratamiento apropiado significa la diferencia entre la recuperación completa y la muerte (Abuelo, 2007).

### 1.3.1.3 Nefritis tubulointersticial

La nefritis tubulointersticial (NTI) puede deberse a múltiples causas entre ellas la exposición a fármacos, los procesos infecciosos y las enfermedades autoinmunes, y sus manifestaciones pueden ser agudas o crónicas.

En la **NTI aguda**, el daño produce disfunción tubular renal, con o sin insuficiencia renal. La disfunción es generalmente reversible, gracias a la capacidad regenerativa que poseen las células tubulares. Para restaurar la función será necesario solventar el daño que produce inflamación y fibrogénesis facilitando así su regeneración y reconstrucción (Hewitson, 2009). La **NTI crónica** se caracteriza por fibrosis intersticial y atrofia tubular que llevan a insuficiencia renal crónica (Higgins y col., 2008).

La fibrosis tubulointersticial está relacionada con un mal pronóstico, representativo de la etapa final de la mayoría de las enfermedades renales.

### 1.3.1.4 Carcinoma de células renales

La primera mención histórica acerca de la existencia de tumores renales data de 1826, cuando Konig los describe por primera vez, pero no fue hasta 1861 cuando Wolcott, de manera accidental, realizó la primera nefrectomía de un riñón tumoral, aunque inicialmente pensó que se trataba de la metástasis de un hepatoma (Delahunt y Thornton, 1996). Los tumores renales se clasifican en dos grupos atendiendo a su localización:

- Tumores de la vía urinaria: normalmente son carcinomas de células transicionales, cuyo origen es el urotelio que tapiza cálices y pelvis renal, similares a los del uréter y en gran medida a los de vejiga.

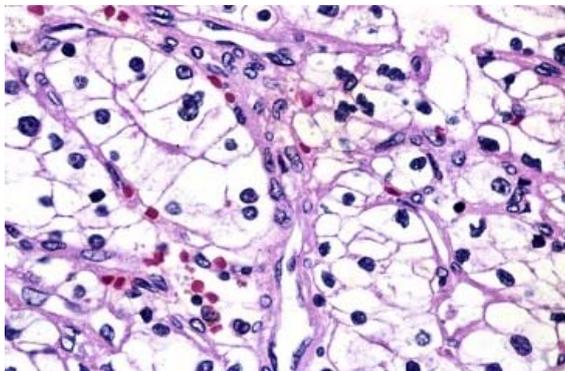
- Tumores del parénquima renal: cuya variedad más frecuente es el **carcinoma de células renales (CCR)**. Representan el 90% de todas las patologías malignas del riñón (Li y Kaelin, 2011) y, por ello, es objeto de nuestro estudio. En base a su apariencia histológica, el CCR se clasifica en diferentes subtipos (Tabla 2), siendo los más frecuentes los carcinomas de células claras, papilares y cromóforas.

**Tabla 2.** Clasificación e incidencia del CCR según la OMS (Eble 2004; Dinesh y col., 2009; Dvorakova y col., 2010; Latif y col., 2011).

Tipo de tumor	Incidencia	Células de origen
Carcinoma de células renales de células claras	74,8%	Túbulo contorneado proximal
Carcinoma de células renales de tipo papilar	12,2%	Túbulo contorneado distal
Carcinoma de células renales de tipo cromóforo	7,9%	Células intercalantes
Oncocitoma	1,8%	Células intercalantes
Carcinoma de los conductos colectores de <i>Bellini</i>	< 1%	Conductos colectores de la médula renal
Carcinoma renal medular	< 1%	Conductos colectores distales de la médula renal
Carcinomas asociados con translocaciones en Xp11	< 1%	–
Carcinoma asociado con neuroblastoma	< 1%	–
Carcinoma mucinoso tubular y fusocelular	< 1%	–
Carcinoma de células renales inclasificable	< 1%	–
Adenoma papilar	< 1%	–



El 75% de los casos de CCR diagnosticados son **carcinomas de células claras** (ccCCR), también conocido como adenocarcinoma renal, tumor Grawitz o hipernefroma. Son neoplasmas generados en células de túbulo contorneado proximal y se manifiestan con patrones de distinta arquitectura: sólido, acinar y alveolar. A nivel histológico, el ccCCR se caracteriza por presentar células con contornos bien delimitados, núcleos redondos centrales y un citoplasma claro como consecuencia de la extracción de lípidos y glucógeno durante el procesamiento del tejido (Brugarolas, 2009) (Fig. 2).



**Figura 2:** Fotografía representativa de un citoplasma de carcinoma de células claras. (Aumento 500x).

#### 1.3.1.4.1 Epidemiología

El CCR ocupa el tercer lugar de mortandad entre los tumores urológicos, siguiendo al de próstata y al de células transicionales de vejiga (Pascual y Borque, 2008). A pesar de que en los últimos años se ha producido un mayor número de pacientes diagnosticados durante una etapa temprana de la enfermedad, casi un 50% de los pacientes con CCR mueren en aproximadamente 5 años (Cho y col., 2011). A partir de los años 70, se ha observado un aumento en la incidencia del CCR, debido probablemente al desarrollo de nuevas técnicas de imagen. La Sociedad Americana Contra el Cáncer estimó en 2011, cerca de 60.000 nuevos casos de cáncer renal de los cuales unos 37.000 fueron hombres y alrededor de 24.000 mujeres.

Es importante destacar que el CCR es una enfermedad que raramente aparece antes de los 40 años (Corgna y col., 2007). El 80% de los pacientes que la

padecen están entre la 4ª y la 6ª década de vida (Pascual y Borque, 2008). La incidencia incrementa rápidamente con la edad siendo anualmente menor del 2% en pacientes menores de 40 años, 38% de 60-65 años y 46% a partir de 75 años (Corgna y col., 2007). Además, la tasa de incidencia varía sustancialmente en función de la zona geográfica (Tabla 3). En países europeos y de Norteamérica las tasas son altas mientras que, en Asia y Sudamérica la incidencia es baja. En los diferentes países de un mismo continente existe una gran variabilidad. En Europa existen igualmente diferencias, Serbia 2,9% y República Checa 15,2%, por ejemplo. Esta diferencia permanece incluso dentro de un mismo país, siendo en España mayor la incidencia en la zona del País Vasco y Cantabria (Anglada y col., 2009). Entre mujeres la incidencia, en la mayoría de los casos, es la mitad que en los hombres pero las diferencias geográficas se mantienen. En España, la incidencia en hombres y mujeres es de 4,7% y 2,3%, respectivamente. Estos datos sugieren que, en esta enfermedad, **la exposición ambiental tiene un papel fundamental** (Chow y col., 2010).

**Tabla 3.** Distribución geográfica del CCR (Pascual y Borque, 2008).

Incidenca	Zona
Alta	Dinamarca, Nueva Zelanda, Noruega, Escocia
Moderada	EEUU, Australia, Bélgica, Francia, Holanda
Baja	<b>España</b> , Irlanda, Italia, Venezuela, India, China

#### 1.3.1.4.2 Etiología

En la actualidad, el CCR es una enfermedad relativamente poco frecuente (3% de los tumores malignos en el adulto); por ello, su etiología no ha sido tan estudiada como en otro tipo de tumores. Hasta la fecha, se conocen los siguientes factores de riesgo asociados al desarrollo de un carcinoma renal:

- **Tabaco:** El tabaquismo se considera claramente el factor de riesgo más relacionado con el CCR. El primer informe para determinar un factor de riesgo



para el cáncer renal data de 1966, estudio que examinó las causas específicas de muerte en un millón de pacientes y donde se comprobó que la mortalidad en fumadores era el doble que en no fumadores (Hammond, 1966). Aunque aún no se conoce su mecanismo patogénico, existen evidencias de que uno de los compuestos principales del humo del tabaco, el benzo- $\alpha$ -piren-diol epóxido (BPDE) produce mutaciones en el cromosoma 3p21.3, relacionadas con la tumorigénesis en varias neoplasias, entre ellas el carcinoma renal. La relación entre el tabaquismo y el CCR es dosis-dependiente acumulativa, siendo destacable que, el riesgo se incrementa un 58% en mujeres fumadoras de más de un paquete al día. Este riesgo parece disminuir en ex-fumadores que llevan sin fumar más de 10 años. Se ha demostrado también un mayor riesgo de desarrollar el tumor entre los fumadores ocasionales y los fumadores pasivos.

- **Obesidad:** se estima que más del 40% de CCR en EEUU y del 30% en Europa se deben a un exceso de peso severo. A nivel mundial, existe un incremento del número de personas que padecen obesidad, lo que parece contribuir al aumento de la incidencia de esta enfermedad, pero no explica los balances actuales de algunos países. Existen varias hipótesis sobre el mecanismo que relaciona el CCR con la obesidad. Éstas incluyen hipoxia crónica del tejido, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia compensatoria, entorno endocrino y producción de adipocinas, respuesta inflamatoria inducida por la obesidad, peroxidación lipídica y estrés oxidativo, aunque existen pocas evidencias directas en humanos (Chow y col., 2010).

- **Hipertensión:** es un factor que parece ser significativo para el desarrollo del CCR. Aunque el mecanismo no se conoce debidamente, parece que cambios funcionales o metabólicos en las células del túbulo renal provocan carcinogénesis (Pascual y Borque, 2008).

- **Carcinógenos químicos:** la exposición de determinados trabajadores a algunos carcinógenos químicos como asbestos, solventes orgánicos, cadmio o hidrocarburos aromáticos policíclicos, presenta una estrecha relación con el riesgo de sufrir CCR. El periodo de exposición a estos compuestos está

íntimamente relacionado con el riesgo de padecerlo apareciendo, en algunos casos, en tan solo 3 años (Corgna y col., 2007).

- **Herencia genética:** la mayoría de los CCR son esporádicos, pero existen formas raras de cánceres familiares que se transmiten con carácter autosómico dominante. Aunque solo representan un 4% de los carcinomas renales, estas formas familiares son muy valiosas para el estudio de la carcinogénesis renal. La más relevante es el síndrome de *von Hippel-Lindau (VHL)* proceso caracterizado por la presencia de hemangioblastomas en el cerebelo y la retina, en el que se desarrollan tanto quistes renales como CCR. Se trata de una mutación en el gen *VHL* que codifica para una proteína supresora tumoral, cuya función es mediar la degradación por ubiquitinas de factores inducibles por hipoxia, (HIFs). La pérdida de su función conlleva la acumulación de HIF, y por tanto, un aumento de la expresión de sus genes diana, muchos de ellos relacionados con la angiogénesis, linfangiogénesis, invasión y mitogénesis (Oya, 2009).

#### 1.3.1.4.3 Sistemas de clasificación del CCR

La estadificación en el cáncer renal ha estado sometida a controversia. En 1969 Robson introdujo una clasificación que rápidamente fue aceptada y que únicamente se emplea en los Estados Unidos. La crítica más evidente a esta clasificación es que no tiene en cuenta, de forma explícita, el tamaño del tumor característica decisiva en el tratamiento y pronóstico de cada caso. En Europa se utiliza la clasificación TNM.

### Clasificación TNM

El sistema de **clasificación TNM** (tumor, nódulos, metástasis) fue desarrollado históricamente como un método para clasificar a los pacientes con cáncer en grupos con diferente riesgo de progresión de la enfermedad. Es un método globalmente aceptado que describe la extensión local anatómica del



cáncer (estadio del tumor), y su extensión a los ganglios linfáticos (estadio nodal) o a órganos distantes (estadio metastático).

La primera clasificación TNM del CCR fue propuesta en 1974 y ha sufrido diferentes modificaciones (Moch y col., 2009). Recientemente, la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) y el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC) publicaron la 7ª edición de la clasificación TNM para el CCR (Greene y Sobin, 2009).

A continuación, se muestra un esquema de la última edición del sistema de estratificación TNM para el carcinoma de células renales realizado en 2009.

## **T-Tumor primario**

**TX:** No se puede evaluar el tumor primario.

**T0:** No hay evidencia del tumor primario.

**T1:** Tumor  $\leq 7$  cm de diámetro, limitado en el riñón.

- **T1a:** Tumor  $\leq 4$  cm de diámetro mayor, limitado al riñón.
- **T1b:** Tumor  $> 4$  pero  $\leq 7$  cm de diámetro mayor.

**T2:** Tumor  $> 7$  cm de diámetro mayor, limitado al riñón.

- **T2a:** Tumor  $> 7$  cm pero  $\leq 10$  cm de diámetro mayor.
- **T2b:** Tumor  $> 10$  cm limitado al riñón.

**T3:** La extensión del tumor abarca las venas principales o a los tejidos perirrenales, pero no a la glándula suprarrenal ipsilateral y no por fuera de la fascia de Gerota.

- **T3a:** Tumor que se extiende macroscópicamente a la vena renal o a sus ramas segmentarias o tumor que invade la grasa perirrenal o del seno renal (peripélvica) pero no por fuera de la fascia de Gerota.
- **T3b:** Tumor con extensión macroscópica a la vena cava por debajo del diafragma.
- **T3c:** Tumor con extensión macroscópica a la vena cava por encima del diafragma o que invade la pared de la vena cava.

**T4:** Tumor que invade por fuera de la fascia de Gerota (incluyendo la extensión por contigüidad a la cápsula suprarrenal ipsilateral).

### N-Nódulos linfáticos regionales

- **NX:** Los ganglios linfáticos regionales no pueden evaluarse.
- **N0:** No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
- **N1:** Metástasis de un solo ganglio linfático regional.
- **N2:** Metástasis de más de un ganglio linfático regional.

### M-Metástasis a distancia

- **M0:** No hay metástasis a distancia.
- **M1:** La metástasis a distancia se hace patente.

### TNM Grupos por Estadios según TNM

- **Estadio I:** T1 N0 M0.
- **Estadio II:** T2 N0 M0.
- **Estadio III:** T3 N0 M0; T1, T2, T3 N1 M0
- **Estadio IV:** T4 cualquier N M0, cualquier T N2 M0, cualquier T, cualquier N M1.

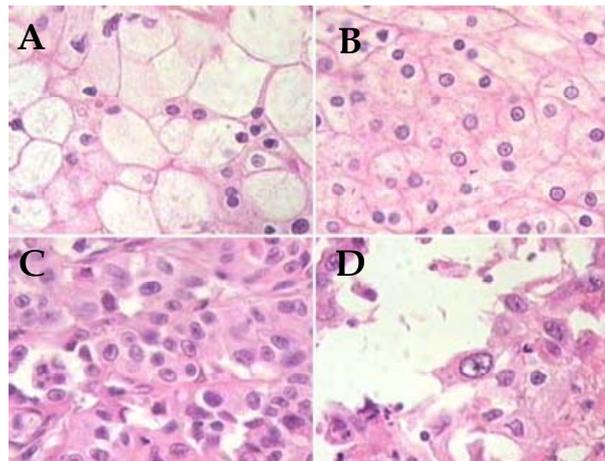
### Clasificación Fuhrman

Además del estadio, en todos los CCR debe determinarse el grado nuclear de Fuhrman, referido al tamaño y forma del núcleo; ha demostrado tener una buena correlación con el pronóstico siendo, en la actualidad, el mejor indicador del grado histológico en todos los carcinomas renales (Fuhrman y col, 1982). La gradación se realiza atendiendo al grado nuclear (Fig. 3).

- **Grado 1.** Núcleos redondos, uniformes (aprox. 10  $\mu\text{m}$ ); nucléolos no visibles o de difícil detección a 400X.
- **Grado 2.** Núcleos más grandes (aprox. 15  $\mu\text{m}$ ) con contornos irregulares; se ven pequeños nucleolos a 400X.
- **Grado 3.** Núcleos más grandes (aprox. 20  $\mu\text{m}$ ) con contornos más irregulares; nucleolos prominentes a 100X.

- **Grado 4.** Con las mismas características del grado 3 pero con más núcleos pleomórficos o multilobulados, con o sin células fusiformes (sarcomatoides).

El grado nuclear se ha visto correlacionado con el estadio tumoral, el tamaño del tumor, la presencia de metástasis, la afectación ganglionar, vascular y de la grasa perirrenal (Bretheau y col., 1995).



**Figura 3.** Fotografías representativas del grado histológico en el carcinoma renal (aumento 400x). A: Grado 1. B: Grado 2. C: Grado 3. D: Grado 4. (tomado de [www.kidney pathology.com](http://www.kidney pathology.com)).

#### 1.3.1.4.4 Diagnóstico

A nivel clínico, el CCR suele permanecer oculto durante la mayor parte de su evolución patológica (Corgna y col., 2007). La presentación clásica de dolor, hematuria y masas en el flanco solo aparece generalmente en el 9% de los pacientes y es, con frecuencia, indicativo de enfermedad avanzada.

El desarrollo de las técnicas de diagnóstico por imagen ha modificado el patrón diagnóstico de estos tumores. En la actualidad, más del 50% de los carcinomas de células renales son diagnosticados de forma accidental durante una evaluación radiológica por síntomas o procesos no relacionados con el mismo (Hernando y col., 2008).

#### 1.3.1.4.5 Tratamiento

El tratamiento, al igual que en la mayoría de tumores malignos, depende del tamaño y extensión del tumor, de la edad del paciente y de su salud. Un tercio de los pacientes tiene enfermedad metastásica avanzada y entre un 20-40% de los que se someten a resección quirúrgica de un tumor primario desarrollarán metástasis (Bukowski y col., 2009). Si se diagnostica a tiempo y el tumor es de pequeño tamaño, se puede tratar mediante resección quirúrgica parcial (nefrectomía parcial), y si el tumor es de gran tamaño, se extirpa el riñón afectado (nefrectomía radical). Para algunos pacientes existen otras opciones, como seguimiento periódico por imágenes o ablación del tumor utilizando alta energía que afecta sólo a las células tumorales (Janet y Torpy, 2011). La administración de altas dosis de interleuquina-2 (IL-2) ha sido la terapia utilizada, con el inconveniente de generar una alta toxicidad con una mínima eficacia (McDermott, 2011).

El CCR se encuentra entre los tumores más resistentes a la terapia sistémica. En los últimos años el conocimiento de la biología del CCR se ha traducido en importantes avances en el tratamiento de pacientes con metástasis. Desde diciembre de 2005, la FDA (“Food and Drug Administration”) ha aprobado seis nuevos fármacos cuya diana son las moléculas implicadas en la enfermedad avanzada y que han mostrado magníficos beneficios en ensayos clínicos en fase III (Wright y Kapoor, 2011; Cáceres y Cruz-Chacón, 2011; Pirrota y col., 2011; Posadas y Figlin, 2012):

- *Sunitinib*, *pazopanib* y *sorafenib* inhiben directamente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).
- *Bevacizumab* y *axitinib* actúan bloqueando a los receptores de VEGF.
- *Temsirolimus* y *everolimus* inhiben la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR).

Estos medicamentos dirigidos molecularmente, representan la próxima generación de fármacos contra el cáncer, causando menos efectos tóxicos en las células normales que la administración de altas dosis de IL-2 y ejerciendo, en



cambio, una **inhibición selectiva de la proliferación de células tumorales** (McDermott, 2011). El término CCR engloba a una gran heterogeneidad de tipos tumorales que desde un punto de vista morfológico y molecular, comparten rutas moleculares comunes, lo que se puede considerar como un factor clave para aproximarse a los diferentes tratamientos clínicos de los subtipos de CCR (Milella y Felici, 2011).

## 1.2 Procesos relacionados con el desarrollo tumoral y factores implicados

El crecimiento, invasión y metástasis tumoral en su génesis necesitan que se desencadenen procesos tales como proliferación de las células tumorales, digestión proteolítica de la matriz extracelular, migración celular hacia el torrente sanguíneo, extravasación e infiltración en tejidos distantes, entre otros. En este apartado, se muestra una visión general de los principales procesos y moléculas de señalización implicados en la iniciación, desarrollo y metástasis del CCR.

### 1.2.1 Proliferación

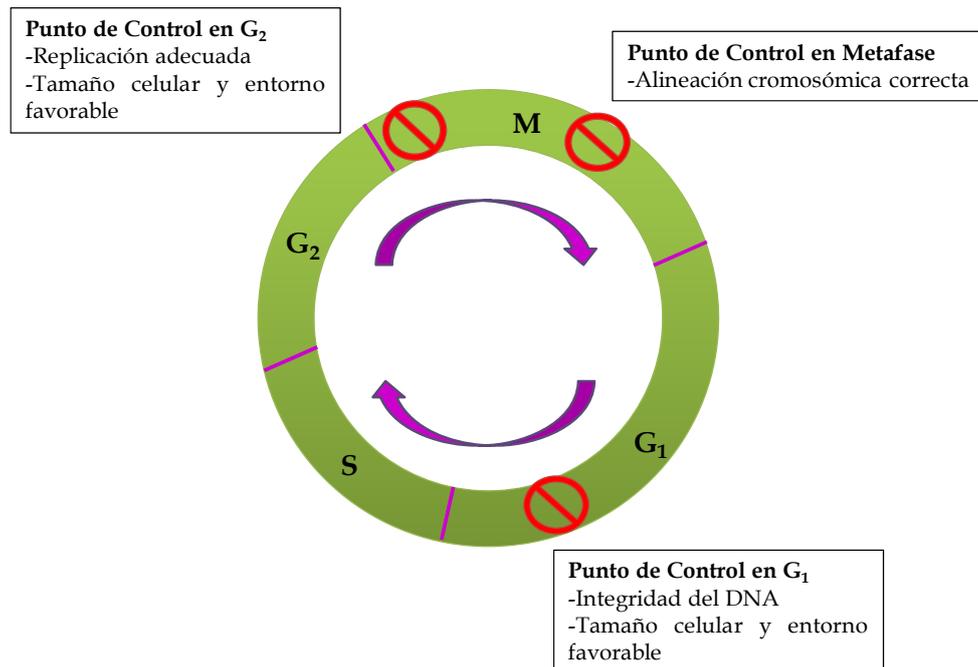
En los primeros años de vida, el ritmo de división celular es muy elevado permitiendo el crecimiento; pero en el adulto, con excepción de las células hematopoyéticas, la mayoría se encuentran en estado de quiescencia. El desarrollo tumoral comienza cuando unas determinadas células evaden los mecanismos celulares que regulan el crecimiento.

La progresión del ciclo celular a través de sus diferentes fases, gap 1 ( $G_1$ ), síntesis (S), gap 2 ( $G_2$ ) y mitosis (M), está regulada por hechos secuenciales que incluyen la activación y subsecuente inactivación de ciclinas y quinasas de dependientes de ciclinas (CDKs). CDKs son un grupo de serin/treonin quinasas que forman complejos con las ciclinas (Tabla 4):

**Tabla 4:** Tipos de complejos ciclina-CDK en mamíferos, dependiendo de la fase del ciclo celular.

Fase del ciclo	Ciclina	CDK
G <sub>1</sub>	Ciclina D	CDK4, CDK6
G <sub>1</sub> /S	Ciclina E	CDK2
S	Ciclina A	CDK2
M	Ciclina B	CDK1 (ó Cdc2)

Durante el ciclo celular, la célula pasa al menos tres puntos de control o “checkpoints”, que se localizan: el primero, antes de finalizar la fase G<sub>1</sub>, el segundo, al finalizar la fase G<sub>2</sub> justo antes de la entrada en fase mitótica y el tercero, antes de entrar en anafase. De este modo, el organismo es capaz de evitar la proliferación de una célula dañada si no se consiguiera la reparación de la lesión (figura 4).

**Figura 4:** Esquema representativo de los puntos de control del ciclo celular. Se muestran los requisitos necesarios para que el sistema considere óptima la continuidad del ciclo.

La integridad del DNA se verifica tanto en el punto de control G<sub>1</sub> como en G<sub>2</sub>. Ante la presencia de **DNA dañado**, se genera una señal que retrasa la entrada en fase M. El mecanismo depende de la proteína **p53**, que se acumula



en la célula en respuesta a las alteraciones del DNA, deteniendo el sistema de control en G<sub>1</sub> e impidiendo la entrada en mitosis.

El gen *p53* es uno de los **genes supresores tumorales** más conocidos, cuya proteína no sólo puede detener el ciclo, sino que también participa en la apoptosis cuando el daño en el DNA es irreparable. Codifica para una proteína de 393 aminoácidos, de estructura compleja (Fig. 5) y que presenta dominios perfectamente definidos. En su extremo N-terminal contiene el dominio de transactivación (TAD) seguido de una región rica en prolinas. Este dominio TAD le permite la interacción con proteínas reguladoras como: MDM2 implicada en la regulación de los niveles celulares de p53; diferentes componentes del complejo de iniciación de la transcripción; y las acetiltransferasas p300 y CBP, que actúan como coactivadores, acetilando el dominio C-terminal, y regulando así la función de p53. A continuación, presenta el dominio de unión al DNA (DBD), que conforman el núcleo central de la molécula. En el extremo C-terminal se localiza el dominio de tetramerización (TD), y el dominio de autoregulación negativa (NAD), que contiene las regiones de acetilación y las de unión no específica al DNA (Joerger y Fersht, 2007).



**Figura 5:** Estructura de p53.

Los niveles celulares de p53 están estrechamente regulados, y su actividad está modulada tanto por modificaciones post-traduccionales, como por interacciones con multitud de proteínas de señalización. En condiciones fisiológicas, p53 está latente y se mantiene a bajos niveles de expresión por la proteína MDM2. Esta proteína se une a p53 y facilita su translocación desde el núcleo al citoplasma para que p53 sea degradado. Cuando las células reciben

señales de estrés por hipoxia, radiación o quimioterapia u otros daños directos en el DNA, p53 se fosforila en múltiples regiones, entre las que se incluyen las implicadas en su unión a MDM2. Esto conduce a su activación y al bloqueo de su degradación (Shen y col., 2011). En función del factor desencadenante de la activación de p53, se pueden activar unas moléculas u otras, es decir, cada señal activa p53 por una vía diferente.

Cuando el DNA presenta un daño reversible, aumentan los niveles de p53, que activan la transcripción de p21, proteína capaz de inhibir la actividad quinasa del complejo ciclina E-Cdk2. Se evita de este modo la fosforilación y posterior degradación de las proteínas del retinoblastoma (Rb), implicadas en la represión del ciclo en fase G<sub>1</sub>. Además, p21 es capaz de unirse al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), componente de la DNA pol δ sintetizada durante la fase S (Shen y col., 2011) (Fig. 6). Esta unión impide la progresión de la replicación y reparación del DNA (Prives y Gottifredi, 2008). Si el DNA es reparado, la proteína p53 se libera del promotor del gen p21, provocando el descenso en los niveles de p21. Esto permite restaurar la actividad del complejo ciclinaE-Cdk2 y la progresión del ciclo celular.

En algunos tipos celulares, p53 es capaz de activar una amplia variedad de proteínas proapoptóticas como Bax, de disminuir la regulación de la proteína antiapoptótica Bcl2, así como inducir la sobreexpresión de proteínas mitocondriales que generan reacciones oxidativas y favorecen la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial. De este modo, p53 desencadena la apoptosis en respuesta a un daño severo (Galluzi y col., 2008).

El daño en el DNA que se genera en situaciones de hipoxia, induce la activación de p53 lo que lleva a una disminución de VEGF, mermando así la capacidad angiogénica tumoral (Reuter y col., 2010). p53 también puede limitar la tumorigénesis a través de la autofagia, provocando la muerte celular mediante la activación de genes como *AMPK*, *DRAM*, y *SESN1/SESN2*. Sin embargo, el papel de la autofagia en la supresión de tumores es complejo, ya

que también podría tener efectos a favor de la supervivencia mediante la promoción de la generación de ATP cuando los nutrientes son limitantes. Curiosamente, p53 también puede ejercer efectos no autónomos que son fundamentales para la supresión de tumores; estas funciones se destacan por la capacidad de p53 para impedir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis (Brady y Attardi, 2010; Liang, 2010). Estos aspectos son recogidos en la figura 6.

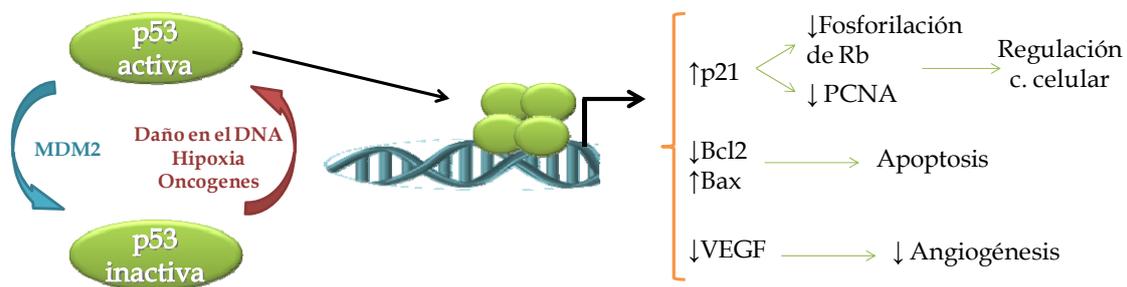


Figura 6: Modelo de regulación de la proteína p53 (Modificado de Smith y col., 2003).

### 1.2.2 Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos capilares sanguíneos, fundamental para el desarrollo fisiológico normal, pero también asociado a patologías como artritis reumatoide o nefropatías diabéticas. El desarrollo del sistema vascular es crucial para el crecimiento y metástasis tumoral (Bhargava y Robinson, 2011).

El **factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)** es, hasta la fecha, el elemento clave en la patogénesis del CCR. Es una molécula diana importante en la que se basan numerosos ensayos en fase clínica, con el fin de bloquear su regulación. La vía de activación de VEGF es responsable del reclutamiento, la migración y la expansión de las células endoteliales, elementos característicos de la **angiogénesis tumoral** del CCR (Albiges y col., 2011). VEGF fue descubierto como un factor soluble derivado del tumor, capaz de inducir permeabilidad de las células endoteliales y angiogénesis. Desde entonces, se han identificado siete miembros que forman parte de la familia de VEGF: VEGF-A (denominado VEGF), -B, -C, -D, -E, factor de crecimiento placentario

(PlGF)-1 y 2 (Robinson y col., 2010). VEGF-A se expresa en casi todas las células bajo condiciones hipóxicas o de estrés, incluyendo las células endoteliales. Esta expresión es elevada en tejidos que están en continua remodelación o crecimiento como es el caso del ciclo reproductivo femenino, aterosclerosis o tumores (Bates, 2010). Los tumores con gran capacidad proliferativa suelen estar expuestos a hipoxia, especialmente en su parte central, activando la expresión de factores inducibles por hipoxia, **HIFs**, que regulan la expresión de VEGF (Semenza, 2010). El CCR de células claras es un tumor altamente angiogénico, como resultado de un incremento en la expresión de VEGF debido a la inactivación de VHL (Oya, 2009). Actúa a través de receptores presentes en las células endoteliales. Existen dos grandes grupos de receptores: VEGFR-1, -2 y -3 y neuropilina (NRP)-1 y -2 (Robinson y col., 2010). La unión a sus receptores provoca su homo o heterodimerización, y su autofosforilación en residuos de tirosina, permitiendo su unión a proteínas con dominio SH2. Así se activan múltiples vías de señalización (Bates, 2010).

La expresión de VEGF está regulada por diferentes factores de transcripción, siendo HIF, STAT3 y NFκB los más relevantes en el carcinoma de células claras (Jung y col, 2005; Djordjević y col, 2008). VEGF ejerce efectos pleiotrópicos en las células endoteliales (Fig. 7). Es capaz de desencadenar toda una serie de mecanismos implicados en migración, invasión de la membrana basal, proliferación y neovascularización.

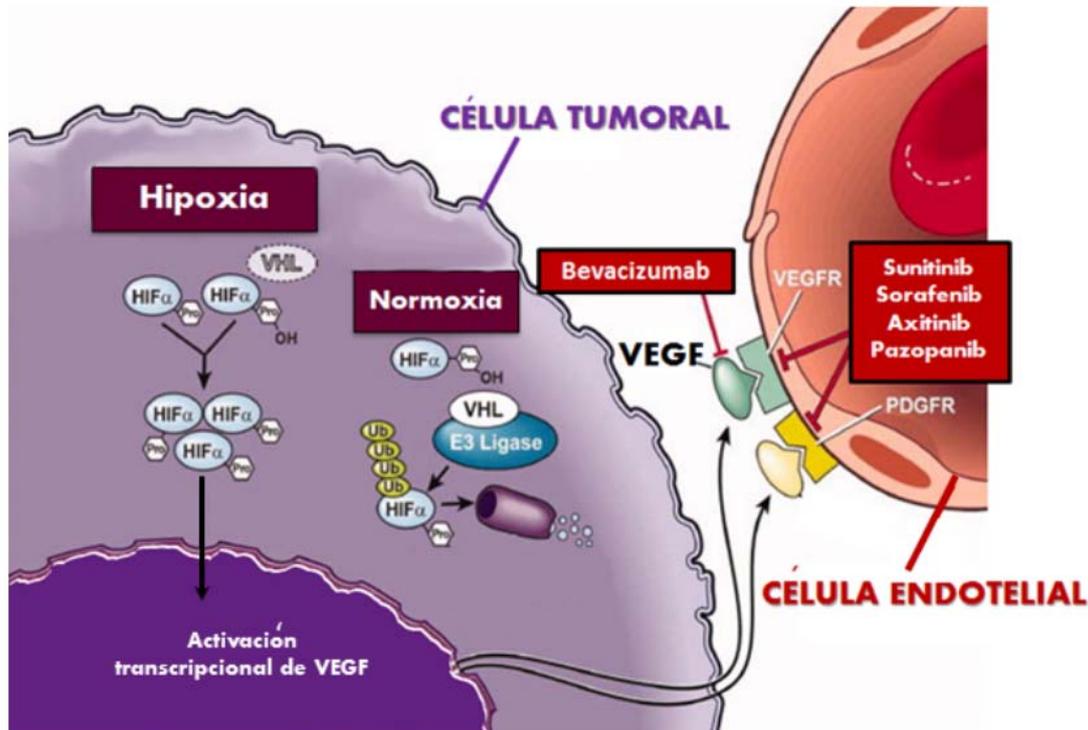


Fig. 7. Mecanismos de activación de VEGF en células tumorales. Implicación de VHL/HIF. Dianas sobre las que actúan los fármacos antiangiogénicos (Modificado de Brian y Rini, 2009)

### 1.2.3 Adhesión

Uno de los procesos clave en el desarrollo de la metástasis es la pérdida de adhesión de las células tumorales, que permite su desprendimiento y facilita la invasión de tejidos circundantes.

Las uniones intercelulares son necesarias para el correcto mantenimiento de la polaridad y la integridad de las células y los tejidos. Entre las moléculas estructurales que forman parte de las uniones de tipo adherente (AJ), se encuentra el complejo formado por las proteínas **E-cadherina/β-catenina**. Su función es vital para mantener las propiedades de adherencia celular tanto en el epitelio como en los tumores epiteliales, e integrar la señalización intra- e intercelular (Banumathy y Cairns, 2010; Tian y col., 2011).

**E-cadherina**, es una glicoproteína transmembrana que interacciona con el citoesqueleto a través de las proteínas intracelulares cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y p120) y con otras E-cadherinas presentes en las membranas de las células adyacentes. Se

trata de una proteína supresora tumoral, cuya pérdida está asociada a un mal pronóstico en la mayoría de tumores. En muchos casos, la pérdida funcional se puede ocasionar por aberraciones cromosómicas, represión de la transcripción o hipermetilación del DNA (Lineham y col., 2007).

**$\beta$ -catenina**, es un coactivador transcripcional que se considera una molécula emergente clave en la patogénesis del cáncer renal. La vía de activación de  $\beta$ -catenina puede ser independiente de E-cadherina, mediada por la vía de señalización de Wnt. Se trata de una ruta implicada en el desarrollo normal y un incremento aberrante puede inducir tumorigénesis, promoviendo la activación de  $\beta$ -catenina libre en el citoplasma (Barbolina y col., 2011)

En células quiescentes normales, si  $\beta$ -catenina no está asociada a E-cadherina, incrementan sus niveles citosólicos y es fosforilada en sus residuos de treonina y serina, para ser degradada en el proteosoma. En células tumorales, los bajos o ausentes niveles de expresión de E-cadherina no pueden secuestrar a  $\beta$ -catenina, incrementándose sus niveles citoplasmáticos. Wnt regula positivamente a  $\beta$ -catenina, inhibiendo su fosforilación, ubiquitinación y degradación. Si  $\beta$ -catenina es estable, entra al núcleo y junto al factor de transcripción LEF-TCF activa la transcripción de genes diana implicados en la oncogénesis como c-myc, ciclina D1 o CD-44 (Fig. 8) (Banumathy y Cairns, 2010; Jamieson y col., 2012).

La adhesión célula-célula puede verse afectada por la pérdida de E-cadherina o por cambios en la expresión de cateninas, influyendo en la migración, el crecimiento celular y la supervivencia de las células neoplásicas (Ronkainen y col., 2010). En el CCR de células claras, la inactivación de VHL conlleva la pérdida de expresión de E-cadherina, que está asociado a un incremento de la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina y a la adquisición de un fenotipo celular invasivo (Evans y col., 2007; Lineham y col., 2007).

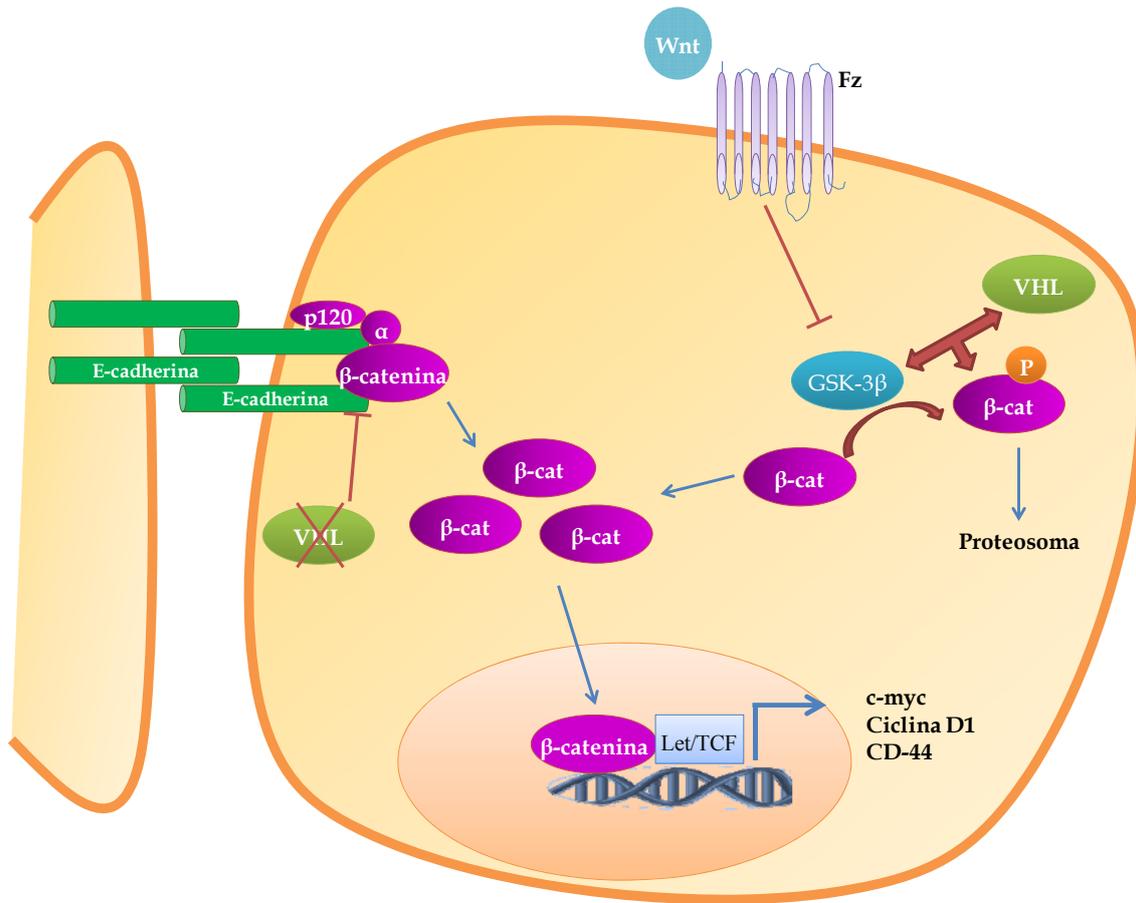


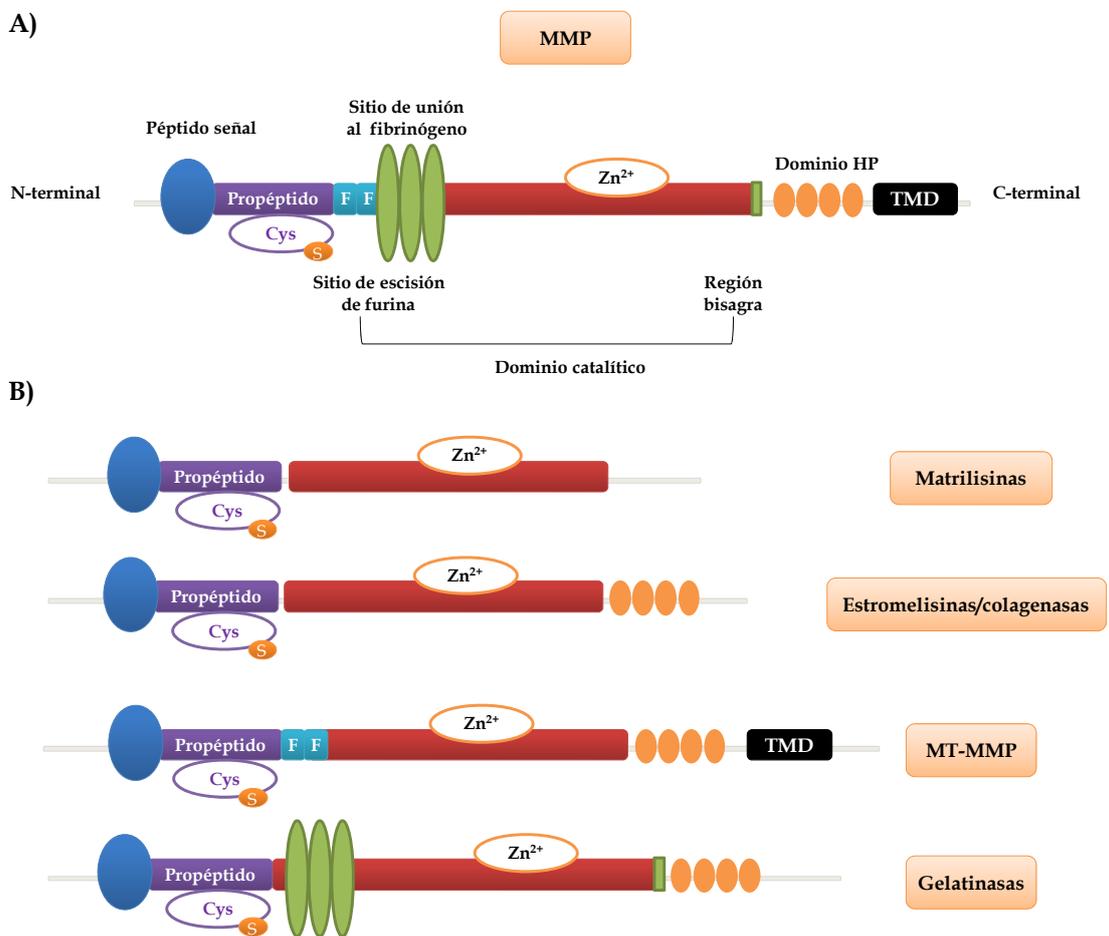
Figura 8. Regulación de la vía de señalización de  $\beta$  catenina por E-cadherina y Wnt.

### 1.2.4 Degradación de la matriz extracelular

La letalidad que se desencadena en la mayoría de los tumores se debe principalmente a la extensión de las células tumorales hacia otros órganos o tejidos, y a la generación de focos secundarios distantes. Para metastatizar e invadir, una célula tumoral debe atravesar varias barreras físicas como la membrana basal y el tejido conectivo. Las **metaloproteasas de la matriz** (MMP) son enzimas proteolíticas implicadas en la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, que juegan un papel clave en la progresión y metástasis de una amplia variedad de tumores, entre los que se incluye el CCR (Velinov, 2010; Mikami y col., 2011).

Basándonos en la estructura y la especificidad de sustrato, las MMPs se pueden dividir en cinco grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelinas,

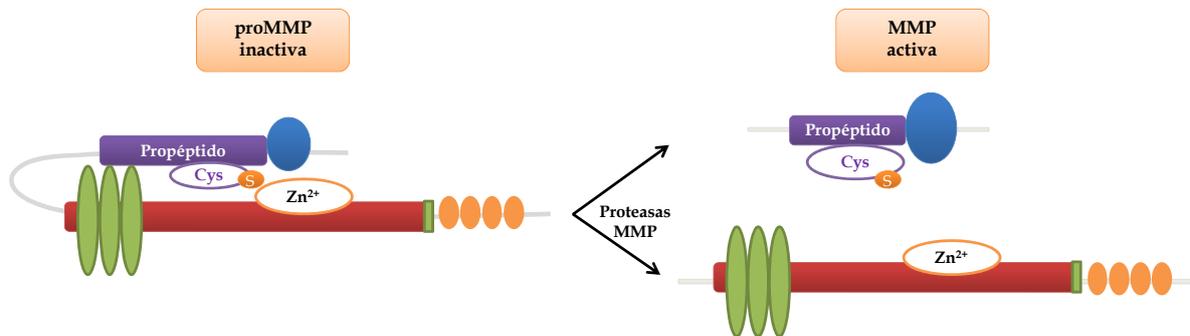
matrilisinas y MMP de la membrana (MT-MMP) (Liu y col., 2012). Todas las MMPs comparten una estructura común que se compone de: un **péptido señal**, necesario para direccionar su secreción al exterior celular; un **propéptido**, que presenta un residuo de cisteína que se une al  $Zn^{2+}$  en el sitio activo del dominio catalítico, permitiéndoles mantenerse en estado latente; un **dominio catalítico** conservado, y un **dominio hemopexina** que le confiere la especificidad de sustrato así como la interacción con los inhibidores endógenos (Fig. 9) (Rosenberg, 2009).



**Figura 9. A.** Estructura general de las MMPs. **B.** Dominios específicos de cada grupo de MMPs (Modificado de Liu y col., 2012).

La mayoría de las MMPs, con excepción de las MT-MMPs, son secretadas y actúan en el espacio extracelular. En estado latente, se encuentran en forma de zimógeno, que es la proenzima inactiva. La cisteína del dominio propeptídico

interacciona con el ión  $Zn^{2+}$  del dominio catalítico inactivando a la MMP. La activación de la proMMP se consigue por escisión del prodominio por proteasas como plasmina u otras MMPs, liberando la enzima activa (Fig. 10) (Klein y Bischoff, 2011).



**Figura 10.** Mecanismo de activación de las gelatinasas.

Las gelatinasas son las principales MMPs implicadas en el desarrollo de un nuevo sistema vascular, al permitir la degradación proteolítica de la membrana basal vascular, abriendo el camino para la migración de las células endoteliales y formar así nuevos vasos sanguíneos (Klein y Bischoff, 2011). Por esta razón, las gelatinasas han sido la familia de las MMPs más estudiada en clínica humana. Se compone de dos miembros: MMP2 y MMP9.

- **MMP2** o gelatinasa A es una enzima capaz de escindir la gelatina, el colágeno de tipo I, IV y V, la elastina y la vitronectina. Se secreta en forma de proenzima de 72 kDa, que está sujeta a una extensa glicosilación. La expresión de la MMP2 es **constitutiva**, y sus niveles de expresión génica no se modifican por la mayoría de estímulos proinflamatorios, debido a que en su promotor, a diferencia de la MMP9, carece de sitios de unión para factores de transcripción como la proteína de activación (AP1) o NFκB. En cambio, presenta sitios de unión para otros factores de transcripción como son la proteína de activación 2 (AP-2) o p53. La proMMP2 se activa mediante la formación de un complejo con el inhibidor tisular de la MMP2 (TIMP2) y la proMT-MTT 14. Esta metaloproteasa de membrana elimina el dominio de la proMMP-2 por escisión proteolítica, obteniéndose la enzima activa de 64 kDa. Si la concentración de

TIMP2 es demasiado alta, se inhibe la activación tanto de MMP14 como de MMP2. Además de esta vía de activación, la proMMP2 también puede ser activada por la trombina y la proteína C activada. La MMP-2 difiere de otras MMPs en que su dominio catalítico contiene regiones ricas en cisteína similares a las regiones de unión de colágeno de tipo II que se repite en la fibronectina. Estos insertos se requieren para la unión y escisión de colágeno y elastina. A través de su capacidad para degradar el colágeno de las membranas basales vasculares, las gelatinasas están implicadas en la neovascularización tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, siendo el caso de la metástasis tumoral (Liu y col., 2012; Klein y Bischoff, 2011).

- **MMP9** o gelatinasa B es el miembro más complejo de esta familia. También presenta actividad proteolítica frente al colágeno tipo IV, el principal componente de la membrana basal. La MMP-9 se expresa como una proenzima de 92 KDa, que dará lugar a la enzima activa de 83 KDa. El gran tamaño de la MMP-9 en relación con la MMP-2 se puede atribuir a un inserto de colágeno V fuertemente O-glicosilado que une el dominio metaloproteasa al dominio hemopexina. La activación de la proMMP-9 puede ser mediada por la eliminación del prodominio por serinoproteasas u otras MMPs, o bien por respuesta directa al estrés oxidativo. En su promotor presentan sitios de unión a factores de transcripción como NFκB o AP1. Aunque existe una considerable superposición en los sustratos degradados por ambas MMP, la MMP9 es incapaz de realizar una proteólisis directa de colágeno I. Se ha descrito que la MMP9 desempeña un papel importante en la angiogénesis, ya que está implicada en la liberación de la forma biológicamente activa del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este proceso se complementa con la degradación proteolítica directa de las proteínas de la membrana basal vascular, lo que indica que la MMP9 (incluso más que la MMP2) puede jugar un papel crucial en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Curiosamente, el dominio hemopexina de la MMP9 es un factor inhibidor de la angiogénesis. Estos resultados se han demostrado en un modelo xenógrafo con sobreexpresión del



dominio hemopexina de la MMP9, presentando disminuida la capacidad de invasión de las células de glioblastoma (Liu y col., 2012; Klein y Bischoff, 2011).

El incremento en la expresión y actividad de las gelatinasas está relacionado con diferentes tipos tumorales como son el de mama, los uroteliales, de cerebro, de pulmón, de piel o colorrectal entre otros. En la actualidad, los pacientes con CCR presentan elevados niveles de expresión de MMP2 y MMP9 que están asociados a un mal pronóstico de la enfermedad. El incremento en la expresión de ambas MMP se considera un factor relacionado con invasión y metástasis renal, constituyendo un objetivo potencial para el tratamiento de la mayoría de tumores (Mikami, 2011).

### 1.2.5 Estrés oxidativo

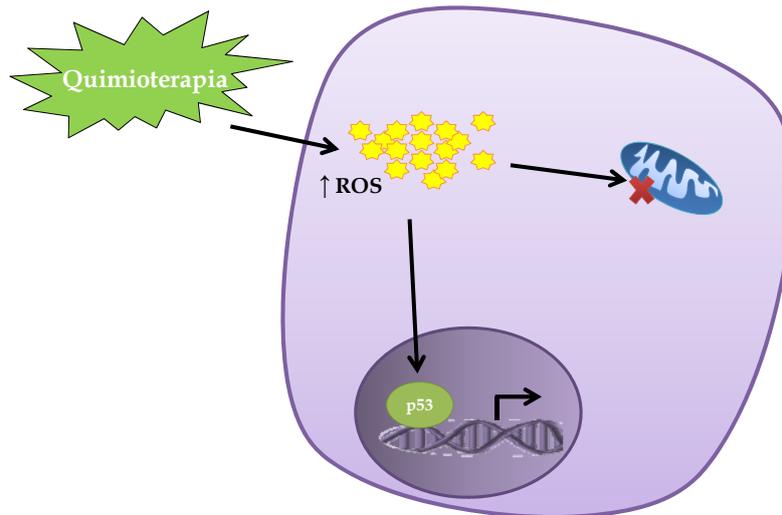
El estrés oxidativo se define como una alteración del balance entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos, también denominados oxidantes o especies reactivas del oxígeno (ROS) y su eliminación a través de mecanismos protectores, denominados antioxidantes (Reuter y col., 2010).

Esta desregulación lleva a alteraciones tanto en condiciones fisiológicas, como en procesos patológicos debido al incremento de la oxidación de importantes moléculas a nivel biológico. Las reacciones de oxidación por ROS están consideradas como el desencadenante del estrés oxidativo, y diferentes enzimas como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa actúan como antioxidantes protectores frente al estrés oxidativo (Stiuso y col., 2010). Los radicales libres como el radical anión super-óxido ( $O_2^-$ ), **peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )**, peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y el ácido hipocloroso ( $HClO$ ), son productos del metabolismo normal de las células; están implicados no solo en los procesos de envejecimiento, sino también de manera directa e indirecta en una amplia variedad de desórdenes clínicos como aterosclerosis, daño por reperfusión, toxicidad pulmonar,

degeneración macular, cataratas, diabetes, fibrosis renal y **cáncer** (Tsai y col., 2011).

Las células necesitan mantener un balance redox para sobrevivir y proliferar. ROS se generan como productos del metabolismo natural y están correlacionadas con la proliferación de las células normales, a través de la activación de diferentes rutas de señalización relacionadas con el crecimiento. Sin embargo, cuando se incrementan los niveles de ROS, las células se exponen a un estrés oxidativo que puede activar diferentes mecanismos permitiendo a las células hacer frente a estos cambios (Chibber y col., 2012).

La producción de ROS se puede considerar un arma de doble filo. Por un lado, los niveles de ROS están incrementados en las células tumorales, y el estrés oxidativo puede inducir daños en el DNA provocando inestabilidad genómica y, posiblemente, estimulación de la progresión tumoral. Así, diferentes carcinomas con elevada tasa proliferativa como son el de colon, de pulmón, renal y prostático, tienen incrementada la producción endógena de ROS y los sistemas enzimáticos antioxidantes disminuidos (Coriat y col., 2011). Por otro lado, se sabe que ROS pueden inducir muerte celular en diferentes carcinomas. Debido a los elevados niveles de ROS que poseen las células tumorales, son más sensibles a un estrés oxidativo adicional generado por los agentes anticancerígenos (Coriat y col., 2011). De hecho, la mayoría de fármacos antitumorales afectan a las células cancerosas mediante el aumento de los niveles de ROS intracelulares que controlan la expresión de varios genes oncosupresores como p53, Rb y PTEN y desestabilizan la membrana mitocondrial, generando toxicidad en las células tumorales (Fig. 11) (Gupta y col., 2012).



**Figura 11.** Modelo de regulación de los niveles de ROS intracelulares.

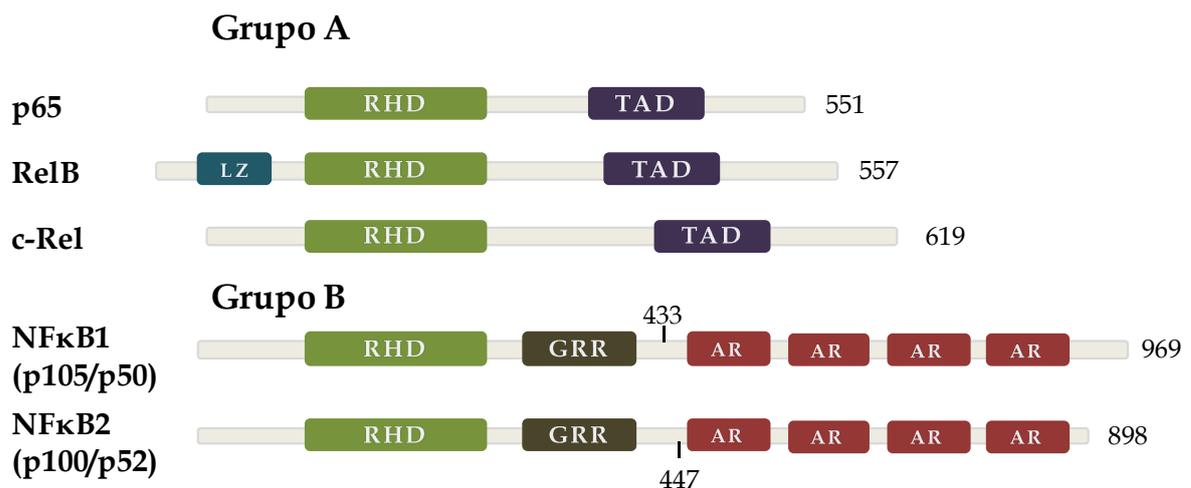
La vulnerabilidad de las células tumorales al estrés oxidativo se debe considerar como una diana terapéutica para el diseño de nuevos agentes antitumorales (Montero y Jassem., 2011).

### 1.2.6 Vía NFκB

NFκB es un factor de transcripción pleiotrópico capaz de regular múltiples genes implicados en **proliferación, supervivencia, angiogénesis y reparación del tejido** (Grivennikov y Karin, 2010) y está considerado como una atractiva diana terapéutica para el tratamiento del CCR (Morais y col., 2011). Este factor de transcripción fue descrito por primera vez en 1986 en células B, caracterizado por unirse al promotor del gen de la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas. Posteriormente, se ha observado que NFκB está presente en casi todas las células. La mayoría de tumores sólidos y linfomas muestran actividad constitutiva de NFκB y rara vez se encuentran mutaciones en los miembros de esta familia. En células tumorales, generalmente se mantiene en estado activo en respuesta a estímulos externos del microambiente tumoral (Grivennikov y Karin, 2010).

La familia de factores de transcripción, NFκB, media diversos mecanismos celulares: proliferación, apoptosis y respuestas inmunológicas e inflamatorias. Se trata de una familia de homo y heterodímeros formada por 5 miembros RelB, RelA (p65), NFκB1, NFκB2 y c-Rel. Todos comparten un **dominio de homología a Rel (RHD)** de 300 aminoácidos en el extremo amino terminal, esencial para la dimerización, la unión al DNA y la transcripción. Se pueden clasificar en dos categorías que dependen de su procesamiento (Fig. 12):

- **Grupo A:** formado por las proteínas RelA o p65, RelB y c-Rel que se sintetizan en su forma activa y gracias a su **dominio de transactivación (TAD)** en su **extremo C-terminal**, son capaces de activar la transcripción génica de forma directa.
- **Grupo B:** este grupo requiere de activación previa para estimular la transcripción. Está formado por las proteínas NFκB1 o p50 y NFκB2 o p52 que se sintetizan en su forma inactiva como p105 y p100, respectivamente. Ambas proteínas se escinden en su aminoácido 433 y 447, para generar las formas activas p50 y p52, respectivamente. En su extremo C-terminal, contienen **dominios de repetición de anquirinas (AR)** cuando están en su forma inactiva.



**Figura 12.** Representación de las subunidades de la familia NFκB.



La formación de homo o heterodímeros entre las distintas subunidades genera diferentes efectos celulares. Los dímeros más estudiados son Rel A (p65)/p50 y Rel B/p52.

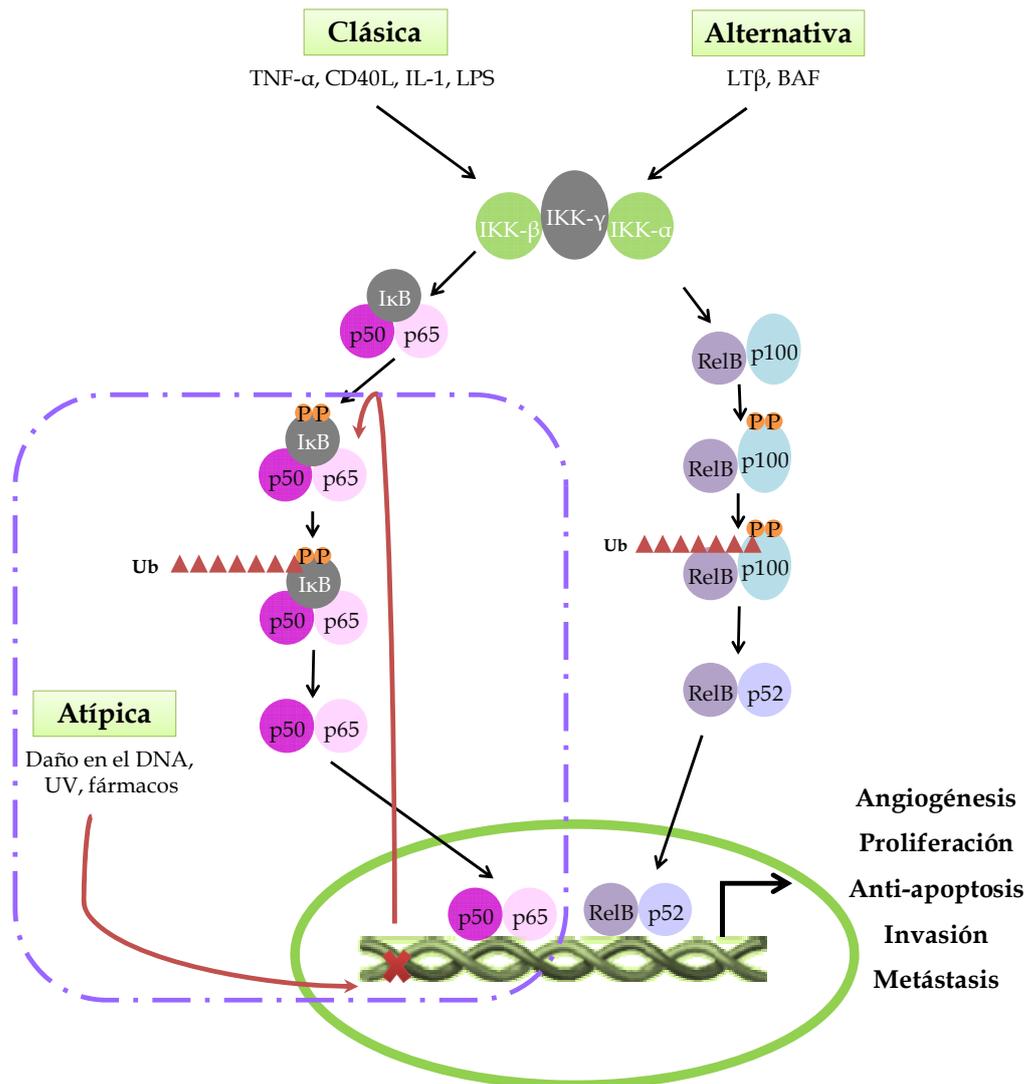
En situaciones fisiológicas, NFκB se encuentra secuestrado en el citoplasma, en su forma inactiva, unido a las proteínas inhibidoras de la familia IκBs. Esta familia está formada por IκB-α, IκB-β, IκB-γ, IκB-ε, p100, p102 y Bcl3, de las cuales la más abundante y estudiada es la IκB-α. La degradación de IκB unido a NFκB es un paso esencial en la liberación de la forma activa de NFκB. Esta degradación se lleva a cabo gracias al complejo de quinasas IKKs. Este complejo está formado por tres subunidades, dos catalíticas, IKK-α e IKK-β, y una reguladora, IKK-γ. El complejo IKK, degrada a IκB y se activa así a NFκB que se transloca al núcleo donde se une al dominio κB de los genes diana regulando su activación y efectos.

Existen diferentes vías de activación de NFκB (Fig. 13) (Morais y col., 2011):

- **Vía clásica:** también denominada canónica, es la más frecuente. Moléculas pro-inflamatorias como TNF-α, ligando CD40, IL-1 o lipopolisacáridos (LPS) activan a la subunidad **IKK-β** que fosforila a IκB-α en las serinas 32 y 36 de su extremo N-terminal. Esta fosforilación poliubiquitina a IκB, lo que lleva a su degradación en el proteosoma; se consigue así la liberación y activación de NFκB que se transloca al núcleo y se activa la transcripción génica.

- **Vía alternativa:** Linfotoxinas-β (LTB) o factor de activación de células B (BAF), entre otros muchos factores, constituyen las señales de activación en esta vía. Se activa **IKK-α** que fosforila en un residuo de serina específico a la subunidad p100. Esta fosforilación permite su ubiquitinización, generándose la subunidad p52, que junto con la subunidad RelB forman un heterodímero que se translocará al núcleo para activar la transcripción de determinados genes.

- **Vía atípica:** se inicia directamente en el núcleo, generalmente en respuesta a radiación UV, anoxia y fármacos anticancerígenos, siendo independiente del complejo IKK. Estas señales desencadenan la activación de moléculas que fosforilan a IκB, liberando NFκB que se transloca al núcleo modulando la activación génica.



**Figura 13.** Esquema de las diferentes vías de activación de NFκB.

La localización nuclear de NFκB está considerada como la activación de la molécula. En el CCR se ha observado la presencia nuclear de NFκB en una gran cantidad de muestras. La mutación en VHL que se observa en los pacientes con CCR de células claras es el factor de riesgo más importante para



el desarrollo de este carcinoma. VHL es un regulador negativo de NFκB y la ausencia de un gen *VHL* funcional incrementa su expresión y actividad.

El papel que presenta NFκB en la oncogénesis viene determinado por efectos antiapoptóticos, proliferativos y proangiogénicos:

- **Efecto antiapoptótico:** induce la expresión de los principales genes antiapoptóticos de la familia *Bcl2*. El gen *Bcl2* tiene múltiples dominios de unión a NFκB en su región promotora lo que conlleva a su activación. Asimismo, Bcl-2 puede activar la vía NFκB mediante la degradación del complejo IKK (IKK-α/IKK-β).
- **Efecto proliferativo:** NFκB antagoniza directamente la función de p53 impidiendo que éste detenga el ciclo celular y promueva apoptosis. Además, NFκB también puede regular la sobreexpresión de ciclinas aumentando descontroladamente la proliferación celular.
- **Efecto pro-angiogénico:** NFκB participa en la sobreexpresión de moléculas pro-angiogénicas como VEGF.

### 1.2.7 Vía de STAT3

**STAT3** (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) es un factor de transcripción considerado como un oncogén constitutivamente activo en muchos tipos de tumores humanos. Los factores ambientales, incluyendo la radiación UV, carcinógenos químicos, infecciones y estrés, pueden activar la vía de STAT3 a través de receptores de citoquinas, *Toll-like*, adrenérgicos o nicotínicos.

Se trata de una proteína de 92 KDa, formada por 770 aminoácidos, que presenta la estructura típica de la familia STAT (Fig. 14) (Aggarwal y col, 2009):

- Un dominio N-terminal enrollado implicado en la interacción protéica (coiled-coil)
- Un dominio de unión al DNA (DBD)
- Un dominio de homología a Src-2 (SH-2)

- Un dominio de transactivación C-terminal (TD)



**Figura 14.** Representación de la estructura de STAT3.

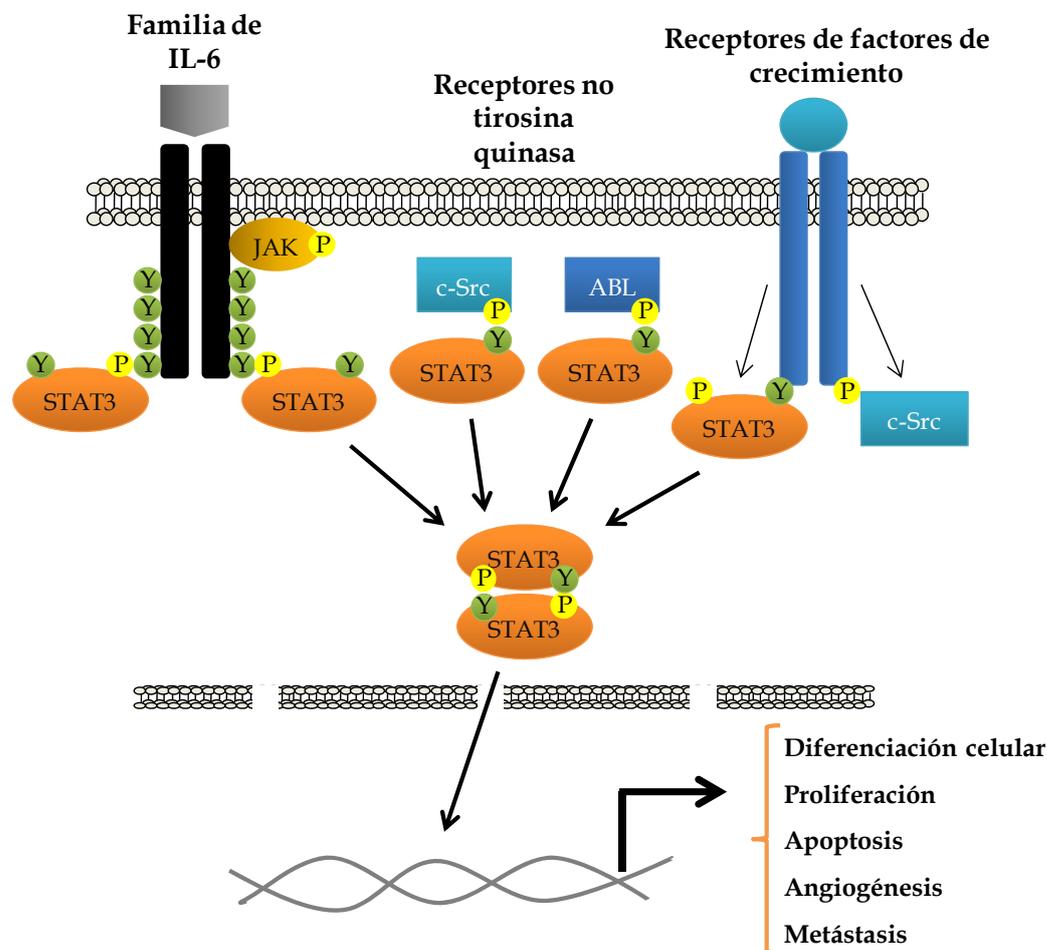
La ruta de señalización de STAT3 es una importante vía en procesos inflamatorios relacionados con el cáncer, ya que induce la expresión de una gran cantidad de genes cruciales implicados en **diferenciación celular, proliferación, apoptosis, angiogénesis y metástasis**. Estudios recientes han demostrado que la tumorigénesis causada por STAT3 está mediada por la vía de señalización de IL-6 (Heinrich y col., 2011).

**Interleuquina-6 (IL-6)** es una citoquina multifuncional que se caracterizó originariamente por actuar en la respuesta inmune e inflamatoria, e inhibir la apoptosis en ambientes tóxicos durante la inflamación. Altos niveles de IL-6 se han detectado en muchos tipos de carcinomas humanos, correlacionándose con proliferación o supervivencia celular en mieloma múltiple, adenocarcinomas de pulmón, cáncer de mama, de próstata, de cuello uterino, gástrico y de esófago (Liu y col., 2010). En el CCR metastásico, más del 50% de los pacientes afectados presentan niveles de IL-6 y de proteína reactiva C (PRC) elevados en suero; dichos niveles se han asociado a un mal pronóstico en CCR (Oya, 2008).

IL-6 es un polipéptido de unos 20 KDa, que actúa a través de la unión a su receptor formado por dos subunidades: una región extracelular de 80 KDa de unión a IL-6 (gp80) y un componente transmembrana de 130 KDa, transductor de la señal (gp130). La unión de IL-6 a su receptor (Fig. 6) induce la dimerización de gp130, la activación de las tirosinas quinasas de la familia Janus quinasas (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2) y la fosforilación de residuos de tirosina de la porción citoplasmática de gp130. Estos residuos fosforilados, generan lugares de acoplamiento que reclutan a las moléculas de STAT3 latentes en el citoplasma. El ensamblaje de STAT3 con la tirosina fosforilada de

los receptores está mediado por su dominio SH-2 y lleva a la fosforilación de los residuos de tirosina específicos de STAT3 en la posición 705 (Y<sup>705</sup>) activándose. La actividad quinasa que produce la fosforilación en Y<sup>705</sup> varía dependiendo del sitio de unión al receptor.

Por otro lado, la fosforilación de STAT3 también puede ser mediada por la actividad tirosina quinasa intrínseca de los receptores de los factores de crecimiento.



**Figura 15.** Regulación de la activación de STAT3 por citoquinas, receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa y receptores sin actividad tirosina quinasa.

Independientemente de la vía de señalización implicada, la fosforilación de STAT3, promueve su homodimerización entre los dominios SH-2/Y<sup>705</sup> de cada monómero. Los dímeros de STAT3 se translocan al núcleo uniéndose al elemento respuesta del DNA en el promotor de los genes a los que regula la

transcripción (Johnston y Grandis, 2011; Heinrich y col., 2011). El dímero de STAT3 activo es capaz de inducir la transcripción de genes implicados en la tumorigénesis a través de la sobreexpresión de proteínas de supervivencia celular (Bcl-xl y Bcl2) y reguladoras del ciclo celular (ciclina D y c-Myc) (Wang y col., 2011). La activación de STAT3 también promueve la angiogénesis del tumor a través de HIF-1 y VEGF (Fig. 15). Por lo tanto se puede considerar a STAT3 un objetivo potencial para el tratamiento del cáncer (Heinrich y col., 2011).

### 1.3 Péptido Intestinal Vasoactivo

En la década de los años 60, Sami Said descubrió que existía en pulmones de mamíferos un agente vasoactivo de naturaleza peptídica que provocaba una vasodilatación sistémica. En 1969, con la colaboración de Viktor Mutt extrajeron y purificaron parcialmente un péptido vasoactivo de pulmón porcino. Con la premisa de que podía existir en otros órganos, se decidieron a aislarlo en duodeno intestinal porcino, descubriendo un potente péptido hipotensivo al que denominaron péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Said y Mutt, 1970). Una vez aislado el péptido, caracterizaron su secuencia, formada por una cadena sencilla de 28 aminoácidos con propiedades básicas debido al predominio de residuos de arginina y lisina. A pesar de que VIP fue aislado en intestino delgado, hoy se sabe que su localización es muy extensa. Fue en 1976 cuando Said y Rosenberg lo identificaron en el sistema nervioso periférico (SNP) y a partir de entonces se le ha considerado como un neuropéptido. Está ampliamente distribuido tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el periférico, actuando como neurotransmisor y neuromodulador en muchos órganos y tejidos como el tracto digestivo, sistema cardiovascular, pulmones, órganos genitales, tiroides, cerebro, riñón y sistema inmune (Said, 1991; Henning y Sawmiller, 2001; Laburthe y col., 2002). En 1978, Cutz y col. demostraron por primera vez la síntesis de VIP en mastocitos y granulocitos. Posteriormente, también se demostró que era sintetizado por neutrófilos y



linfocitos tipo Th2 (O'Doriso y col., 1980; Vassiliou y col., 2001). La amplia distribución de VIP está correlacionada con su implicación en múltiples acciones biológicas e importantes funciones reguladoras (Said, 1991; Said, 2007).

El péptido intestinal vasoactivo está química y biológicamente relacionado con otros nueve péptidos incluidos dentro de una misma familia, que en humanos engloba al péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP), secretina, glucagón, el péptido similar a glucagón 1 y 2 (GLP-1 y GLP-2), el péptido histidina-metionina (PHM), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) y el péptido inhibidor gástrico (GIP). La homología entre sus secuencias explica algunas de las similitudes que presentan en su funciones biológicas (Said, 1991), siendo PACAP el péptido con el que VIP presenta una mayor homología estructural (68%) y funcional, compartiendo afinidad por los mismos receptores (Gozes y Furman, 2003; Dickson y Finlayson, 2009).

El gen que codifica para VIP se localiza en humanos en el cromosoma 6, región q24; está constituido por 8837 pb y, como se muestra en la figura 16, comprende seis intrones y siete exones (Gozes y col., 1984; Linder y col., 1987):

- **Exón I:** con 165 pb, codifica para la región 5' del RNAm, que no se traduce.
- **Exón II:** con 117 pb, codifica para el péptido señal de 21 aminoácidos.
- **Exón III:** con 123 pb, codifica para el extremo N-terminal.
- **Exón IV:** con 105 pb, codifica para el péptido PHM/PHI.
- **Exón V:** con 132 pb, codifica para VIP.
- **Exón VI:** con 89 pb, codifica para el extremo C-terminal.
- **Exón VII:** con 723 pb, codifica para el extremo 3' del RNAm



**Figura 16.** Estructura génica de VIP.

En la región promotora de VIP se localizan cinco elementos reguladores de la expresión génica, o elementos cis (Hahm y Eiden, 1999).

- **Dominio A:** es el elemento específico tisular (TSE), indispensable para activar la transcripción génica tras su unión a proteínas como Oct1 y Oct2, entre otras. Cabe destacar la presencia en este dominio de dos secuencias inhibitoras denominadas VSE-1 y elemento restrictivo-1 (RE-1) (Liu y col., 2001; Hamelink y col., 2004).

- **Dominio B:** contiene una caja E y dos secuencias que, tras ser reconocidas por proteínas MEF2 o proteínas E, activan la transcripción del gen del VIP (Hahm y Eiden, 1999).

- **Dominio C:** contiene elementos represores y sitios de unión a STAT1 y STAT3 (Hahm y Eiden, 1999).

- **Dominio D:** al igual que el dominio C presenta elementos represores, y se sabe que presenta un sitio de unión a la proteína activadora AP-1 (Hahm y Eiden, 1999).

- **Dominio E:** contiene al elemento CRE, elemento de respuesta al AMPc (Tsukada y col., 1987).

En la expresión de VIP juegan un papel importante los procesos de regulación post-transduccional, siendo muy relevantes los mecanismos de estabilización del RNAm. Está descrito que el control de esa estabilización, por unión a diferentes proteínas, se debe a la importancia de la cola de poli(A) del RNAm (Sachs y Wahle, 1993). Otros trabajos han mostrado que las regiones no traducidas (UTR) se caracterizan por presentar secuencias desestabilizadoras que forman complejos específicos junto a proteínas citoplasmáticas, determinando así la expresión o no del gen en función del tejido (Chew y col., 1994; Wolford y Sings, 1995).



La biosíntesis de VIP comienza como una proteína precursora de alto peso molecular, constituida por 170 aminoácidos. Este prepro péptido es metabolizado por peptidasas en el retículo endoplásmico, produciéndose un pro-péptido con 148 aminoácidos, escindido por convertasas en VIP-GKR y PHM-GKR (Bloom y col., 1983) que son a su vez hidrolizados por enzimas tipo carboxipeptidasas B generando VIP-G y PHM-G (Itoh y col., 1983). El producto de su metabolismo por enzimas PAM genera finalmente VIP y PHM (Delgado y col., 2004).

### 1.3.1 Acciones biológicas de VIP

VIP es un neuropéptido con una extensa distribución en el SNC y periférico y con un amplio espectro de acciones biológicas. VIP regula funciones tan diversas como la digestión y la producción o la inmunomodulación (Said, 1986). Tiene un papel muy importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Muller, 1995), así como en la regulación de la situación hormonal (Balsa, 1994). En la tabla 5 se presenta un resumen de estas funciones.

Tabla 5. Acciones biológicas que ejerce VIP.

Efectos sobre el SNC	Referencia
<i>Efectos generales</i>	
Acción hipnótica	Riou y col., 1981
Hipertermia	Clark y col., 1978
Regulación del metabolismo del glucógeno	Sorg y Magistretti, 1992
Influye en los procesos de memoria y aprendizaje	Glowa y col., 1992; Ivanonva y col., 2011
Efecto analgésico	Haghjoo y col., 1996
Desarrollo del cerebro durante la embriogénesis	Moody y col., 2003b
Anorexígeno	Tachibana y col., 2004
Induce neuroprotección en el desarrollo cerebral	Passemard y col., 2011

---

### *Efectos neurotróficos*

---

Aumenta la proliferación, diferenciación y supervivencia	Brenneman y Eiden, 1986; Pincus y col., 1994
Disminuye la apoptosis de las neuronas	Moody col., 2003
Aumenta el desarrollo de neuritas	Pincus y col., 1990
Neuroprotector en patologías inflamatorias	Delgado y Ganea, 2003
Protege de la neurodegeneración porque inhibe la activación de la microglía	Delgado y col., 2008
Inhibe la expresión de COX-2 en macrófagos, microglía y células dendríticas	González-Rey y Delgado, 2008

---

### *Hipotálamo*

---

Aumenta la producción de prolactina	Vijayan y col., 1979; Reichlin, 1988
Modula la liberación de GABA	Reed y col., 2002
Regula la transmisión sináptica en el núcleo supraquiasmático	Itri y Colwell, 2003
Interviene en el mantenimiento de los ritmos circadianos	Harmar, 2003

---

### *Hipófisis*

---

Aumenta la producción de hormona del crecimiento	Vijayan y col., 1979
Aumenta la producción de hormona luteinizante	Vijayan y col., 1979
Aumenta la producción de hormona adrenocorticotropa	Oliva y col., 1982
Acción autocrina/paracrina sobre la hiperplasia inducida	Gomez y Balsa, 2003

---

### **Glándula tiroidea**

---

Aumenta la secreción de hormonas tiroideas	Ahren y col., 1980
--	--------------------

---

### **Glándula suprarrenal**

---

Aumenta la producción de catecolaminas	Malhotra y col., 1988
--	-----------------------

---



## Riñón

---

Inhibe el transportador de Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> por un mecanismo independiente de AMPc	Kniaz y col., 1991
Estimula a la adenilato ciclasa a nivel cortical	Charlton y col., 1991

---

## Páncreas

---

Aumenta la producción de fluido alcalino	Jensen y col., 1978
Reduce el estrés oxidativo en células del acino pancreático	Fujimori y col., 2011

---

## Tracto gastrointestinal

---

Aumenta la relajación de la musculatura lisa	Said y Mutt, 1970
Aumenta la secreción de intestino grueso y delgado	Dockray, 1994
Disminuye la motilidad gástrica e intestinal	Olsson y Holmgren, 2001

---

## Sistema inmune

---

Protege del shock séptico inducido por LPS	Delgado y col., 2000
Regula la producción de gran variedad de citoquinas de manera que ejerce de inmunomodulador en algunas enfermedades	Gomariz y col., 2001; Delgado y col., 2002; Delgado y col., 2003; Juarranz y col., 2004.
Regula la apoptosis y la inflamación	Gomariz y col., 2001; Delgado y col., 2002; Hauk y col., 2011
Protege a las células Th2	Sharma y col., 2006
Previene y mejora la artritis reumatoide	Delgado y col., 2001
Previene y mejora la enfermedad de Crohn	Abad y col., 2003
Modula las funciones inmunes de las células de Langerhans	Kodali y col., 2004
Modula la expresión del factor liberador de corticotropina	Perez-García y col., 2011

---



## Aparato reproductor

Aumenta la esteroidogénesis en el ovario y en el testículo	Ottesen y Fahrendrug, 1995; El-Gehani y col., 1998
Aumenta la erección del pene	Hedlund y col., 1995; Fahrenkrug, 2001
Aumenta la relajación de la musculatura lisa y la vasodilatación	Houdeau y col., 1998

## Sistema cardiovascular

Regula el tono vasomotor normal	Brum y col., 1986
Efecto vasodilatador (mayor en arterias que en venas)	Luu y col., 1993
Efecto inotrópico	Unverferth y col., 1985; Colston y Freeman, 1992
Aumenta el consumo de oxígeno	Feliciano y Henning, 1998
Dilatación de arterias coronarias	Feliciano y Henning, 1998
Aumenta el latido cardiaco	Henning y Sawmiller, 2001

## Sistema respiratorio

Potente relajante de la musculatura lisa (el mayor broncodilatador endógeno)	Palmer y col., 1986
Dilatación de los vasos sanguíneos	Laitinen y col., 1987
Actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso no-adrenérgico/no-colinérgico	Widdicombe, 1998
Inhibe la liberación de mediadores de mastocitos y basófilos	Bousquet y col., 2000
Implicado en balance oxidante/antioxidante endógeno de patologías inflamatorias como asma.	Szema y col., 2011
Efectos complejos sobre la secreción de moco (estimula o inhibe)	Groneberg y col., 2001
Incrementa la curación de heridas y la proliferación en células del epitelio bronquial	Guan y col., 2006; Guan y col., 2009



---

Aumenta el transporte de iones en el epitelio	Groneberg y col., 2001
Protege el epitelio alveolar del daño por hiperoxia	Ao y col., 2011
Regula el transporte a través de CFTR en epitelio bronquial y nasal	Qu F y col., 2011, ; Rafferty y col., 2009

---

## Huesos

---

Aumenta el metabolismo en osteoblastos	Lundberg y col., 1999
Disminuye la reabsorción del hueso por los osteoclastos	Lundberg y col., 2000

---

## Médula ósea

---

Disminuye la proliferación de las células progenitoras	Rameshwar y col., 2002
--	------------------------

---

## Piel

---

Aumenta la proliferación de queratinocitos	Granoth y col., 2000
--	----------------------

---

## Tejido adiposo

---

Efecto lipolítico	Akesson y col., 2005
-------------------	----------------------

---

## Córnea

---

Protege frente al daño de muerte aguda del estrés oxidativo	Koh y Waschek, 2000
Sobreexpresa p-CREB, Bcl2 y N-cadherina en células endoteliales	Koh y col., 2008; Koh y col., 2009; Koh y col., 2011
Aumenta la integridad de explantes	Koh y col., 2011

---

## Células tumorales

### *Cáncer de próstata*

---

Estimula la movilidad de células DU-145	Nagakawa y col., 2002
Induce la producción de IL-6	Nagakawa y col., 2005
Induce diferenciación neuroendocrina	Gutiérrez-Cañas y col., 2005
Induce la expresión del oncogén c-fos	Collado y col., 2005
Incrementa la expresión de VEGF	Collado y col., 2004

Protege de la apoptosis celular	Gutiérrez-Cañas y col., 2003
Induce la expresión de COX-2	Fernández- Martínez y col., 2007
Induce el crecimiento y angiogénesis de tumores prostáticos en un modelo animal	Collado y col., 2007
Induce la transactivación de HER2	Sotomayor y col., 2007
Transactiva al receptor de andrógenos en células LNCaP	Xie y col., 2007
Promueve invasión y migración, incrementando la actividad de MMPs y disminuyendo la expresión de E-cadherina	Fernández-Martínez y col., 2009
Induce transformación maligna de la línea celular RWPE-1	Fernández-Martínez y col., 2010

### *Cáncer de pulmón*

Efectos estimuladores y tróficos	Moody y col., 1993
Inhibe el crecimiento de una línea de células pequeñas de cáncer de pulmón (SCLC)	Maruno y col., 1998
Incrementa la expresión de VEGF	Casibang y col., 2001
Factor autocrino	Moody y col., 2003a

### *Cáncer de páncreas*

Disminuye la proliferación de células Capam-1	Ruellan y col., 1986
Efectos estimuladores y tróficos	Jiang y col., 1997

### *Cáncer epidermoide*

El agonista estructural del VIP $\gamma$ -glutamil 16-diaminopropano ejerce un potente efecto antioxidante	Stiuso y col., 2010
--	---------------------

### *Cáncer de colon*

Estimula la proliferación en células Ht29 de cáncer de colon	Alleaume y col., 2003
Regula la proliferación de células de cáncer gástrico	Li y col., 2007

### *Cáncer de mama*

Incrementa la expresión de c-fos c-myc y c-jun	Casibang y col., 2001
Aumenta la transactivación de EGFR y HER a través del receptor VPAC <sub>1</sub>	Valdehita y col., 2009; Valdehita y col., 2012

### *Carcinoma hepático*

Disminuye la proliferación celular	Absood y col., 2008
------------------------------------	---------------------

### *Otros*

Efectos estimuladores y tróficos en neuroblastoma	Wollman y col., 1993; Lelievre y col., 1996
---	--



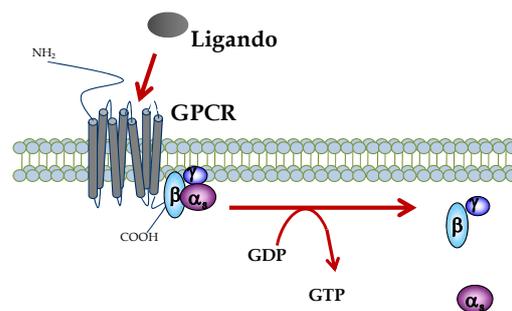
### 1.3.2 Mecanismos de señalización de VIP

Los mecanismos intracelulares que median las acciones de VIP implican diferentes vías de transducción activadas por los distintos receptores a los que se une específicamente,  $VPAC_1$ ,  $VPAC_2$ ,  $PAC_1$  y  $FPRL-1$ . Todos ellos son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que se pueden localizar tanto en la membrana plasmática como en la nuclear de las células diana (Gobeil y col., 2006; Valdehita y col., 2010).

Tras el aislamiento del neuropéptido por Said y Mutt en 1970, se observó que VIP tenía receptores ampliamente distribuidos en diferentes órganos y tejidos, pero no fue hasta 1989 que se consiguió el aislamiento de PACAP por Miyata y col., cuando se determinó que los receptores clásicos de VIP tenían una afinidad similar para PACAP (Laburthe y col., 2002). En 2008, El Zein y colaboradores publicaron la presencia de un cuarto receptor para VIP, el receptor similar al de péptidos formilados, localizado en monocitos humanos y a través del cual VIP es capaz de activar la  $\beta 2$ -integrina. No todos los receptores presentan la misma afinidad para VIP.  $VPAC_1$  y  $VPAC_2$  son los receptores con mayor afinidad,  $PAC_1$  presenta una baja afinidad (Laburthe y Couvineau, 2002), y para el receptor  $FPRL-1$ , no existen datos que permitan conocer la afinidad con la que se une al neuropéptido. Los receptores de VIP se caracterizan por pertenecer a la clase II o B de la familia de los GPCRs (Laburthe y col, 2007; Couvineau y Laburthe, 2012). Son receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas constituidas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Fig. 18). En su estructura se observan 3 bucles extracelulares, 3 intracelulares, un dominio C-terminal intracelular y un dominio N-terminal extracelular, siendo este último dominio el que garantiza la especificidad de los receptores de la clase II ya que disminuye su homología estructural con respecto al resto de GPCRs. En el dominio N-terminal, los receptores de la clase II presentan una secuencia de 10 aminoácidos altamente conservada, de los cuales 6 son cisteínas. La estructura de estas cisteínas permite la interacción adecuada con el

ligando (Laburthe y Couvineau, 2002; Laburthe y col, 2007; Couvineau y Laburthe, 2012)

La vía de señalización de VIP se inicia con la unión a sus receptores. De este modo, se genera un cambio conformacional que permite a los receptores interactuar con las proteínas G. En estado basal, la proteína G forma un trímero que se encuentra unido a GDP. Cuando se produce la unión del ligando al receptor, la proteína G intercambia el GDP por GTP (junto con las proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina, GEF). Posteriormente, como se muestra en la figura 18, sufre un proceso de hidrólisis, donde se separan las subunidades  $\beta\gamma$ , de la subunidad  $\alpha$  unida a GTP (Johnston y Siderovski, 2007; Kobilka, 2007; Oldham y col., 2007).



**Figura 18.** Mecanismo de activación de proteínas G.

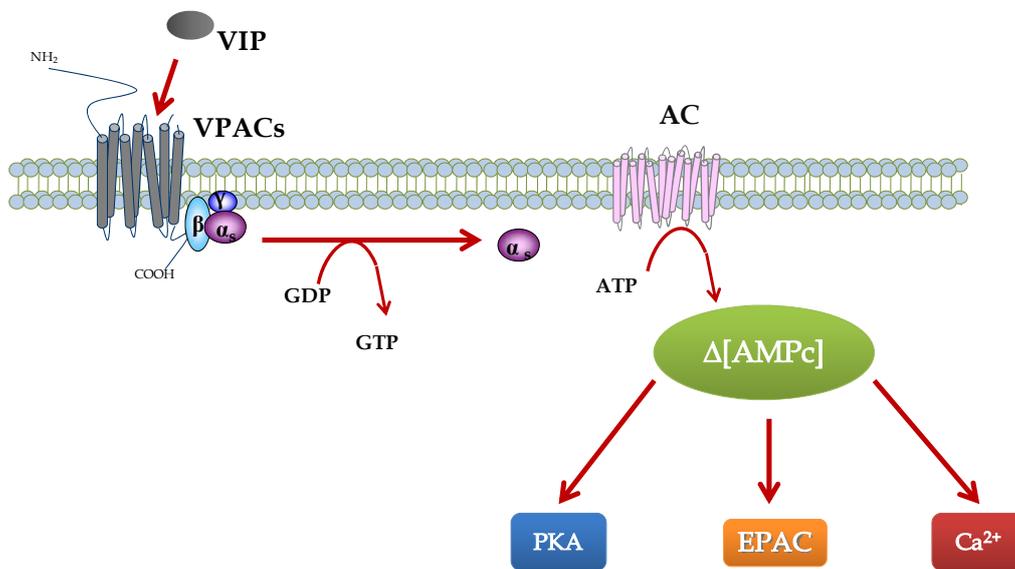
La vía de señalización es diferente dependiendo de la subunidad  $\alpha$  que se active. Existen cuatro tipos principales de proteínas  $G\alpha$  (Leifert y col., 2005; Hill y col., 2010):

- $G_s$ : se caracteriza por estimular un incremento en los niveles de AMPc.
- $G_{i/o}$ : tiene el efecto antagónico de  $G_s$ , ya que disminuye los niveles de AMPc.
- $G_q$ : modula a la enzima fosfolipasa C ( $PLC\beta$ ).
- $G_{12/13}$ : implicada en respuestas mediadas por Rho.

Una de las vías principales para VIP es la mediada por  $G_{as}$  (Couvineau y Laburthe, 2011) que lleva a la activación de **adenilato ciclasa** (AC). La proteína

$G_{\alpha s}$ -GTP estimula a las 9 isoformas de AC presentes en la membrana plasmática, generando un incremento en los niveles de AMPc de la célula.

El segundo mensajero **AMPc** es responsable de la activación de diferentes efectores, entre los que cabe destacar: la proteína quinasa A (PKA), el intercambiador de proteínas activado directamente por AMPc (EPAC o GEF) y el calcio intracelular. PKA y EPAC poseen una afinidad muy similar por AMPc, con una Kd de aproximadamente  $2,9 \mu\text{M}$  (Dao y col., 2006) (Fig. 19).



**Figura 19.** Modelo de activación de diferentes efectores mediado por AMPc.

- **PKA:** es una holoenzima compuesta por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas (R<sub>2</sub>C<sub>2</sub>). Esta proteína se encuentra en el citosol en su forma inactiva y cuando se produce un aumento de AMPc, éste se une al dominio CBD de las subunidades reguladoras. Así se induce la disociación y activación de las subunidades catalíticas y se genera la forma activa (Taylor y col., 1990; Cheng y col., 2008). Existe una amplia gama de efectos celulares mediados por la subunidad C activa ya que está implicada en la fosforilación de una gran variedad de sustratos citoplasmáticos y nucleares. VIP media, a través de PKA, la activación de la proteína de unión al elemento regulador de AMPc, CREB (Guan y col., 2009), que se transloca al núcleo y se une a diferentes

factores de transcripción entre los que se incluyen CRE, NFκB y AP-1 (Delgado y Ganea, 2002; Moody y Gozes, 2007).

- **EPAC:** es una familia de proteínas que actúan como factor intercambiador de nucleótidos de guanina. Existen dos isoformas de EPAC, EPAC1 y EPAC2, como productos de genes independientes en mamíferos. Presentan una región reguladora y una catalítica que es homóloga en ambas isoformas. Estas proteínas contienen un dominio CBD en su región reguladora que está evolutivamente conservado de PKA, y que les permite unirse a AMPc con una alta afinidad. La activación de EPACs está implicada en numerosos procesos celulares como adhesión celular, exocitosis/secreción, diferenciación o proliferación (Cheng y col., 2009). Generalmente, la activación se desencadena por dos vías diferentes de señalización Rap/Raf/Mek(1/2)/Erk(1/2) y PI3K/Akt. Son señales descritas en diferentes líneas celulares (Mirzoeva y col., 2009) y a través de las cuales VIP media sus efectos (Sabbatini y col., 2008; Herrera y col., 2009; Zhang y col., 2010).

- **Calcio:** el  $Ca^{2+}$  se ha considerado como un segundo mensajero independiente de AMPc. No obstante, en los últimos años se ha descrito que un aumento en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  puede estar mediado por un incremento de AMPc (Fung y col., 2011). Está demostrado que VIP regula los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular vía AMPc/PKA dependiente (Hagen y col., 2006).

Existen otras vías de activación de proteínas G mediadas por VIP a través de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> y PAC<sub>1</sub> (Dickson y Finlayson, 2009). Si intervienen los receptores acoplados a **Gi/Gq**, se activa a la fosfolipasa C (PLC). El mecanismo implicado en la activación depende del tipo de subunidad G activada. La subunidad Gi actúa a través de la subunidad βγ (Luo y col., 1999), pero ambas activan PLC que hidroliza a fosfatidilinositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG).

- El DAG puede activar a las proteínas quinasas C (PKC) y D (PKD) (Rozengurt, 2007; Dickson y Finlayson, 2009). En células gliales, hipofisarias,



alveolares y del epitelio nasal se sabe que VIP media sus efectos a través de la activación de PKC (Sun y Halawani, 1995; Nowak y col., 2001; Dejda y col., 2006; Li y col., 2010; Alcolado y col., 2011).

- El IP<sub>3</sub> incrementa los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>; vía independiente de adenilato ciclasa (Langer y Robberecht, 2005).

Hasta la fecha no se han descrito efectos mediados por VIP a través de la proteína G<sub>12/13</sub>.

El receptor FPRL-1 media la activación de diferentes factores de transcripción como NFκB y STAT3. En estas cascadas intracelulares están implicadas moléculas como ERKs, JNK, PKC, PI3K-Akt, p38MAPK, PLC y PLD e induce la movilización de Ca<sup>2+</sup> (Le y col., 2001; Bae y col., 2003; Cattaneo y col., 2010). En células gliales se ha observado que, a través del receptor FPRL-1, se produce un incremento de AMPc que lleva a la activación de ERK1/2 (Braun y col., 2011). Hasta el momento, solo se ha descrito que VIP, a través de FPRL-1, media la activación de PI3K-Akt de manera independiente de AMPc (El Zein y col., 2008). Además, FPRL-1 es capaz de inducir la transactivación de EGFR a través de STAT3, en células de cáncer de pulmón (Cattaneo y col., 2011). Efectos similares sobre la transactivación de miembros de la familia HER, se han observado en respuesta a tratamientos con VIP en células epiteliales de colon (Bertelsen y col., 2004), en células de cáncer de próstata (Sotomayor y col., 2007) y en células de cáncer de mama (Valdehita y col., 2009). Recientemente, se ha publicado que este efecto de VIP está mediado por el receptor VPAC<sub>1</sub> en células de cáncer de mama (Valdehita y col., 2012).

Las interconexiones entre las diferentes vías de señalización activadas por VIP están detalladas en la figura 20.

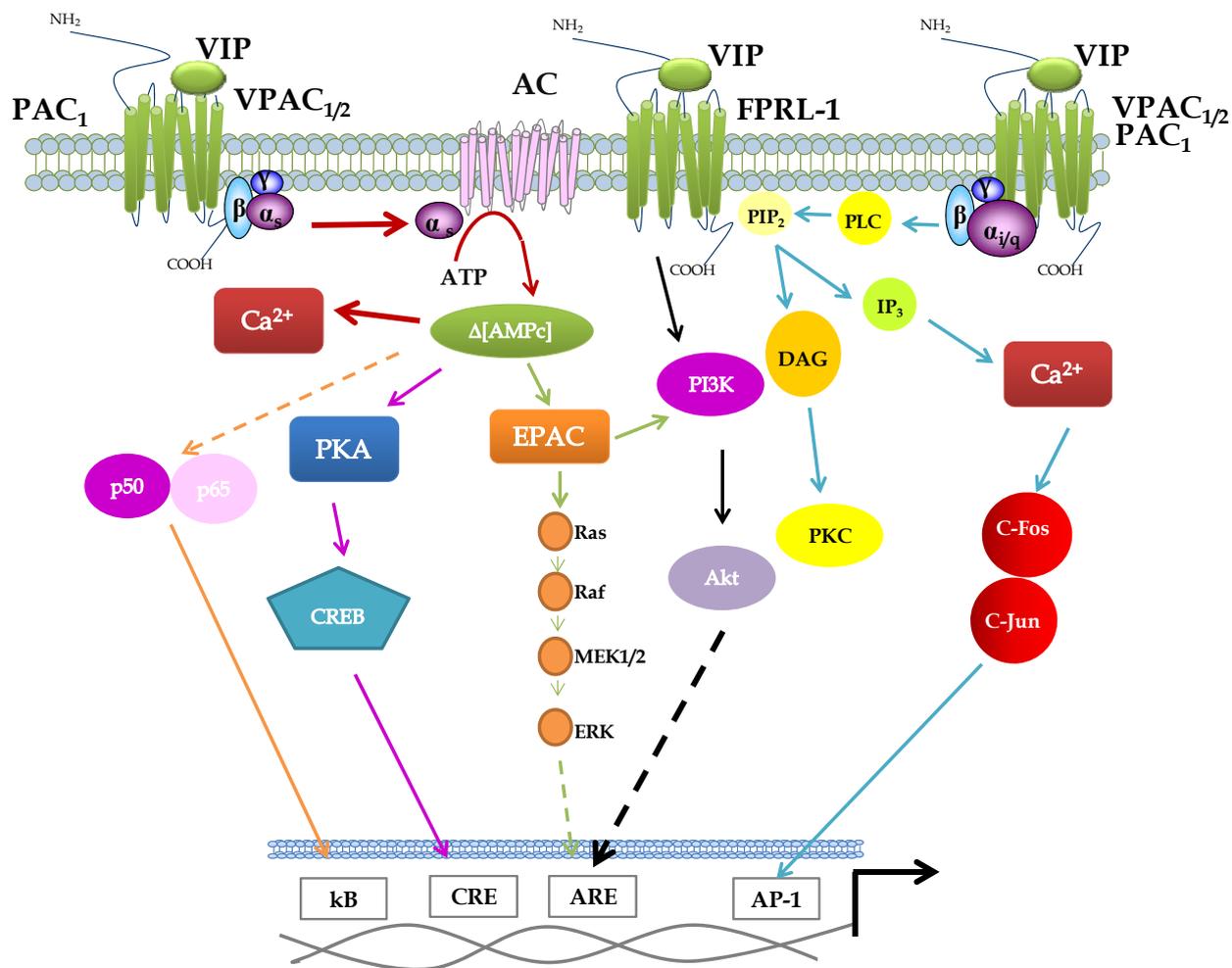


Figura 20. Vías de señalización mediadas por VIP.

### 1.3.3 Antagonista de VPACs: JV-1-53

El diseño de antagonistas específicos frente a los receptores VPAC permite realizar un gran avance en las terapias de señalización.

El grupo de A.V. Schally, basándose en la similitud estructural que existe entre VIP y GHRH, ha desarrollado diferentes análogos de GHRH que también presentan actividad antagonista para los receptores VPAC<sub>1/2</sub> (Gourlet y col., 1998; Varga y col., 1999). Cada uno de estos análogos muestra diferente afinidad por los receptores de ambos péptidos, siendo el denominado **JV-1-53** el más específico para antagonizar a VPAC<sub>1/2</sub>. La estructura de JV-1-53 le hace carecer de actividad antagonista para GHRH, correlacionándolo directamente con VIP.



Estudios previos avalan la capacidad de JV-1-53 para antagonizar a los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en fibroblastos, células de cáncer de próstata, páncreas y mama mediante estudios *in vivo* e *in vitro* (Rekasi y col., 2000; Rekasi y col., 2001; Kiaris y col., 2002; Collado y col., 2005; Valdehita y col., 2010).

### 1.3.4 VIP y riñón

Existen pocos estudios sobre efectos moduladores de VIP en la función renal humana. En 1983, un ensayo con voluntarios tratados con VIP intravenoso demostró modificaciones en los niveles de sodio, potasio y fosfatos, así como un incremento en la acidificación urinaria (Calam y col., 1983). En 1990, el grupo de Charlton demostró en humanos que VIP estimula la adenilato ciclasa renal (Charlton y col., 1991). El inconveniente que se planteaba era que el mecanismo de regulación de VIP en la función renal no se podía conocer mediante estudios *in vivo*, debido a la multitud de factores sistémicos que podían alterar la respuesta renal al VIP intravenoso. Por ello, Kniaz y col., en 1991, procedieron al estudio de la unión y degradación de VIP en membranas luminales y basolaterales altamente purificadas, además de evaluar el efecto de VIP en el transporte tubular tras el aislamiento de túbulo proximales renales de conejo. Sus resultados demostraron la presencia de receptores específicos de VIP en el túbulo proximal y sugirieron que VIP inhibía el transportador de Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> por un mecanismo independiente de AMPc.

En la actualidad, existe una escasa bibliografía sobre el efecto directo de VIP en la función renal, pero se conocen resultados en los que VIP junto a su homólogo estructural PACAP38, inhiben la producción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF $\alpha$ ) inducido por macrófagos estimulados por lipopolisacáridos (LPS), vía en la que se encuentra implicado NF $\kappa$ B. Además, los receptores VPAC<sub>1</sub> y PAC<sub>1</sub>, pero no VPAC<sub>2</sub>, muestran un **papel renoprotector** tras suprimir la producción de citoquinas inducidas por las cadenas ligeras de pacientes con mieloma múltiple en las células del túbulo

proximal (Arimura y col., 2006). Igualmente, PACAP38 previene del daño renal frente a isquemia/reperfusión en modelos in vivo de ratas (Li y col., 2010; Szakaly y col., 2011). Asimismo, PACAP38 revierte la nefrotoxicidad inducida por ciclosporina A (Khan y col., 2011; Reglodi y col., 2012) y actúa como un sensor frente a un estrés en células renales generado por el tratamiento con altas dosis de peróxido de hidrógeno consiguiendo un incremento en la supervivencia celular (Horvath y col., 2010; Horvath y col., 2011a). También, previene del daño renal inducido tras el tratamiento con el agente antitumoral cisplatino (Li y col., 2011; Reglodi y col., 2012).

La homología estructural entre ambos neuropéptidos y la presencia de receptores comunes a nivel renal permite plantear la duda sobre si estos efectos son o no específicos para PACAP38 o están mediados a través del receptor VPAC<sub>1</sub> por el que VIP tiene una mayor afinidad. Por esta razón, es necesario profundizar en el estudio del efecto de VIP y sus receptores en células de túbulo proximal renal.

## **2. Objetivos**





El carcinoma de células renales es una enfermedad multicausal en la que están implicados un gran número de factores de riesgo. Si el tumor se diagnostica en una etapa temprana de la enfermedad la eficacia terapéutica es mayor pero el riesgo de un nuevo rebrote es muy elevado y no existen tratamientos actuales para paliar este problema.

El estudio del VIP y sus receptores ha sido el tema principal y del que ha sido pionero nuestro grupo de investigación. Los estudios más recientes se han centrado en valorar la implicación del neuropéptido en la iniciación, progresión y desarrollo del tumor en próstata y mama. En células renales es muy escasa la información que existe sobre la implicación del VIP en la regulación de sus funciones fisiopatológicas.

En este trabajo se aborda el estudio del sistema receptor/efector del VIP en tejido renal y en células epiteliales de túbulo proximal humanas. Así como su comportamiento frente a situaciones de estrés oxidativo, inflamación y tumoración. Nuestro interés en este último aspecto se dirige al carcinoma de células claras. Los objetivos concretos planteados:

- 1. Estudiar y comparar el sistema receptor/efector del VIP en muestras de tejido tumoral renal y en dos líneas celulares humanas HK2, representativa de un estado no tumoral y A498 de un estado tumoral, analizando los siguientes aspectos:**
  - 1.1.** Valorar los niveles de expresión de VIP, tanto en tejido como en células en cultivo.
  - 1.2.** Estudiar la expresión y localización de los receptores de VIP, tanto en tejido como en células.
  - 1.3.** Comprobar la funcionalidad de los receptores de VIP, en células.
  - 1.4.** Estudiar la implicación del VIP sobre su propio sistema, mediante el análisis de su expresión y la de sus receptores, en células.
- 2. Analizar la acción del VIP sobre la expresión y activación de los factores de transcripción NFkB y STAT3.**

- 3. Demostrar el papel del VIP en la etiología y los mecanismos de señalización implicados en los diferentes fenotipos relacionados con el desarrollo del tumor y metástasis en ambas líneas celulares:**
  - 3.1. PROLIFERACIÓN.** Determinar el efecto del VIP sobre la proliferación celular. Valorar la acción del antagonista selectivo para VPAC<sub>1/2</sub>, JV-1-53, así como el efecto del silenciamiento génico de VPAC<sub>1</sub>.
  - 3.2. ESTRÉS OXIDATIVO.** Estudiar el efecto de VIP en la producción de radicales libres.
  - 3.3. ANGIOGÉNESIS.** Estudiar el efecto del VIP sobre la expresión y secreción del principal factor angiogénico VEGF.
  - 3.4. ADHESIÓN CELULAR.** Valorar las variaciones en la adhesión celular mediadas por el VIP, y la acción del antagonista selectivo para VPAC<sub>1/2</sub>, JV-1-53.
  - 3.5. MIGRACIÓN.** Analizar el efecto del VIP sobre la migración e invasión celular y estudiar la actividad enzimática degradativa de las principales metaloproteasas, así como el efecto del antagonista específico para VPAC<sub>1/2</sub>, JV-1-53.
- 4. Demostrar el efecto del VIP en un modelo experimental de carcinoma de células renales**
- 5. Valorar la implicación del VIP en la citotoxicidad generada en células no tumorales HK2 por un agente externo, determinando los mecanismos implicados.**
  - 5.1.** Estudiar el efecto del VIP en la apoptosis generada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Comparación con células prostáticas.
  - 5.2.** Valorar la implicación del VIP en el efecto inflamatorio generado por LPS, mediante la producción de la citoquina proinflamatoria IL-6.
  - 5.3.** Analizar las posibles modificaciones del sistema receptor/efector del VIP en situaciones citotóxicas.

### **3. Materiales y Métodos**





## 3.1 Materiales

### 3.1.1 Reactivos

#### Empleados en la realización de los cultivos celulares

- Medio DMEM F-12, suero fetal bovino (SFB), suplemento de insulina-transferrina-selenita (ITS), L-glutamina, antibiótico-antimicótico, PBS y tripsina de GIBCO Life Technologies (Barcelona, España). Medio EMEM de ATCC (Barcelona, España).
- VIP de NeoMPS (Estrasburgo, Francia).
- Antagonista de los receptores VPAC<sub>1</sub> y VPAC<sub>2</sub>, JV-1-53 cedido por el profesor A.V. Schally (Universidad de Miami, FL, EEUU).
- Forskolina, 8-CloroAMPc, LPS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de Sigma Aldrich (Madrid, España).
- PD98059 y H89 de Alexis (Grünberg, Alemania). Wortmanina de Calbiochem (San Diego, California, EEUU).
- Ioduro de propidio y Lipofectamina™ 2000 de Invitrogen (Barcelona, España).
- Timidina Tritiada (<sup>3</sup>HT) de Amershan Pharmacia Co. (Madrid, España).
- Bromodesoxiuridina (BrdU) de BD Biosciences (Erembodegem, Bélgica).
- Frascos de cultivo, placas, pipetas etc. de CELLSTARR Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Alemania).

#### Empleados en la obtención de ácidos nucleicos, RT, PCR y RT-PCRQ

- TRI-Reagent®, cloroformo, isopropanol y dietilpirocarbonato (DEPC) de Sigma. Etanol absoluto de Panreac (Barcelona, España).
- Transcriptasa reversa del virus MMLV (Moloney Murine leukemia Virus), Oligo dT, cebadores y dNTPs de Invitrogen.

- Taq polimerasa, agarosa y marcadores de peso molecular de Biotools B&M Labs (Madrid, España). Inhibidor de RNasas (RNasin) y Ditioneitol (DTT) de Promega (Mannheim, Alemania).
- SYBR Green PCR master Mix y Transcriptasa Reversa Multiscribe de Applied Biosystem (Branchburg, NJ, EEUU).
- Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, EEUU)

### **Empleados en la detección y cuantificación de proteínas**

- Agente de tinción para Bradford (dye-reagent), poliacrilamida, persulfato amónico y marcadores de peso molecular para SDS-PAGE de Bio-Rad (Richmond, CA, EEUU).
- Membranas de Nitrocelulosa Bio Trace NT de Pall Corporation (Madrid, España).
- Supersignal® West Pico Chemiluminescent substrate de Pierce (Rockford, IL, EEUU).
- Líquido de montaje para inmunocitoquímica FluorSave™ Reagent con DAPI (Calbiochem, San Diego, California, EEUU)
- Anticuerpos específicos frente a p50, STAT3, p-STAT3, anti- $\beta$ -catenina, Bcl-2 y Bax de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU), frente a PCNA (Zymed, Viena, Austria), frente a p53 de Sigma Aldrich. Anticuerpos frente a VPAC<sub>1</sub> y VPAC<sub>2</sub> de Affinity BioReagents (Golden, CO, EEUU). Anticuerpo frente a FPRL-1 de Abcam (Cambridge, Reino Unido), anti-E-cadherina, anti-anexina II, anti-Nucleoporina p62 y anti-HSP60 de BD Biosciences (Erembodegem, Bélgica). Anticuerpo monoclonal frente a  $\beta$ -actina de Calbiochem (San Diego, California, EEUU).
- Anticuerpos secundarios para western blotting, anti-ratón Sigma y anti-conejo de Calbiochem (San Diego, California, EEUU). Anticuerpos secundarios para inmunocitoquímica, anti-ratón y anti-conejo de Molecular



Probes (Barcelona, España). Anticuerpo secundario universal para inmunohistoquímica (LSAB<sup>®</sup> + System-HRP) de Dako (Glostrup, Dinamarca).

- Kit de ELISA para VEGF<sub>165</sub> de R&D System (Minneapolis, MN, EEUU). Kit de ELISA para VIP de Phoenix Phasmaceuticals, INC. (Karlsruhe, Alemania).
- Formaldehído, metanol, hematoxilina de Carazzi y hematoxilina de Mayer de Panreac (Barcelona, España).

### **Empleados en la determinación de la actividad AC.**

- AMPc, ATP, GTP, teofilina, creatina fosfato, creatina quinasa e isobutimetilxantina (IBMX) de Sigma.
- AMPc-<sup>3</sup>H de Amersham Pharmacia Co. (Madrid, España).
- Líquido de Centelleo Optiphase "Hisafe" 2 de Wallac (Turku, Finlandia).
- Alúmina de Merck (Darmstadt, Alemania).
- Carbón activo de Riedel-de Haën (Hanover, Alemania).

### **Utilizados en la preparación de tampones**

- Acido acético, acetato potásico, metanol, etanol, NaCl, NaOH, sacarosa, ácido tricloroacético (TCA), Tris y Glicina de Panreac (Barcelona, España).
- Aprotinina, azida sódica, azul de bromofenol, bacitracina, bromuro de etidio, carbón activo, creatina fosfato, creatina quinasa, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, GTP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, leupeptina, β-mercaptoetanol, NP-40, ortovanadato sódico (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), pepstatina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), teofilina, Tritón X-100 y Tween-20 de Sigma.
- CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl, DTT, EDTA, EGTA, KHPO<sub>4</sub>, SDS, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de Merck (Madrid, España).

- Albumina sérica bovina (BSA) de Boehringer (Mannheim, Alemania).

### Reactivos empleados en animales de experimentación

- BD Matrigel TM Matrix de BD Bioscience (San José, California, EEUU).

## 3.1.2 Modelos experimentales

### 3.1.2.1 Tejido renal humano

Las muestras de tejido renal humano proceden del Servicio de Urología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares, Madrid. Tras las intervenciones quirúrgicas el Servicio de Anatomía Patológica clasifica el tejido y separa pequeñas fracciones en fresco que serán conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización o incluidas en bloques de parafina. Estas muestras corresponden a tejido tumoral y no tumoral del mismo paciente. Los experimentos llevados a cabo con este tipo de muestras se realizan siguiendo las recomendaciones adoptadas por la Ley 14/2007, de 3 de julio, sobre Investigación Biomédica.

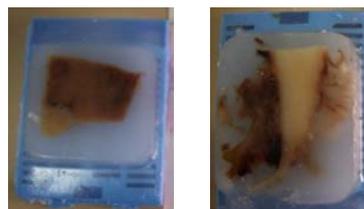
#### Tejido fresco



Control

Tumor

#### Tejido incluido en parafina



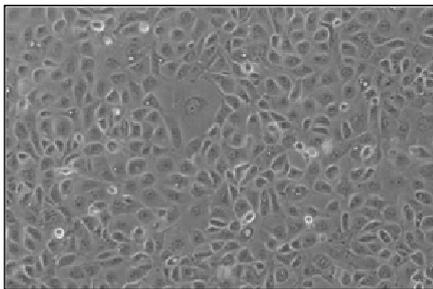
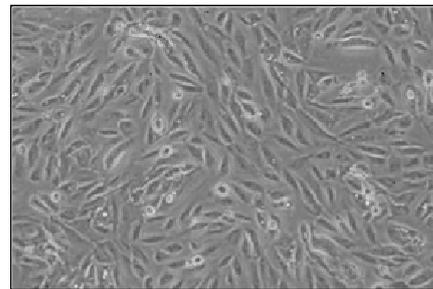
Control

Tumor

### 3.1.2.2 Líneas celulares

Las líneas celulares humanas empleadas son representativas del epitelio del túbulo proximal renal: **HK-2**, células control (ATCC) y **A498**, células de carcinoma humano de células claras (ATCC). Las células HK2 se mantienen en medio DMEM F-12 que contiene 1% de insulina-transferrina-selenita (ITS) y 1%

de L-Glutamina. La línea celular A498 se mantiene en medio EMEM. Todos los medios de cultivo se suplementan con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina). Las células se conservan a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> y en un ambiente húmedo. El medio se cambia cada 2 días y, al llegar a un 70-80% de confluencia, se levantan las células con tripsina/EDTA tras un lavado previo con PBS y se realiza una siembra con una 20.000 o 30.000 células/cm<sup>2</sup>.

**HK2****LÍNEA CELULAR NO  
TUMORAL****A498****LÍNEA CELULAR  
TUMORAL**

### 3.1.2.3 Animales de experimentación

Para realizar los ensayos *in vivo* se han utilizado ratones macho atímicos nu/nu (BALB/cOlaHsd-Foxn1<sup>nu</sup>) de cuatro semanas de edad (Harlan Ibérica, Barcelona, España). Los animales se mantuvieron en la zona de tratamientos crónicos en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá. El ensayo se ha realizado de acuerdo a la normativa estatal vigente para el uso y cuidado de los animales de experimentación, y según los criterios de la Unión Europea para la investigación animal (Real Decreto 1201/2005 del 10 de Octubre).



La inducción de tumores subcutáneos se ha llevado a cabo mediante la inyección de las células tumorales A498 con *Matrigel<sup>TM</sup> Matrix* en una proporción 1:1. Se inoculan 5 millones de células previamente deprivadas y tratadas como se indica a continuación, en el flanco derecho de cada ratón. Se establecen 4 grupos, cada uno de ellos formado por 7 ratones:

- **Grupo 1:** Ratones inoculados con células A498 sin tratar.
- **Grupo 2:** Ratones inoculados con células A498 tratadas durante 2 h con VIP 1 $\mu$ M.
- **Grupo 3:** Ratones inoculados con células A498 pretratadas 10 min con el antagonista 0,3  $\mu$ M JV- 1-53.
- **Grupo 4:** Ratones inoculados con células A498 pretratadas 10 min con JV-1-53 y 2 h con VIP.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Ácidos nucleicos

#### 3.2.1.1 Aislamiento de ARN

La extracción del ARN se lleva a cabo mediante un “kit” comercial TRI Reagent (Sigma). El protocolo varía dependiendo del ensayo.

- Si se va a aislar el ARN de secciones de tejido, se deben trocear y homogeneizar con 1 ml de TRI reagent. Para separar los restos de tejido no homogeneizado se centrifugan a 12.000 xg durante 10 min, recogiendo el sobrenadante.
- Si el protocolo se realiza sobre células, después de los diferentes tratamientos, se retira el medio y se añade 1 ml de TRI reagent por cada 2-2,5 millones de células.

A continuación, se añade cloroformo que permite la disociación de ácidos nucleicos y proteínas. Se mantiene durante 5-15 min a T<sup>a</sup> ambiente y se centrifuga a 12.000 xg para conseguir una separación completa en fases. Se recoge la fase acuosa que es la que tiene el ARN, descartando el resto y se añade



isopropanol (1:1 vol/vol) para precipitarlo. Finalmente, se centrifuga a 12.000 xg durante 15 min para obtener el precipitado, que se lava con etanol 70% dos veces centrifugando entre cada lavado.

El precipitado se resuspende en agua estéril tratada con 0,1% DEPC (Dietilpirocarbonato) para evitar la actividad de las ribonucleasas. A continuación se determinó la cantidad y la calidad del ARN midiendo la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm. Para ver el grado de pureza se utilizó la relación de la absorbancia 260/280, utilizando muestras con una relación superior a 1,8.

### 3.2.1.2 RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCRQ)

Esta técnica de cuantificación se realiza con un preparado comercial SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystem) realizando un protocolo de RT-PCR en un solo paso.

Para llevar a cabo la reacción, se utilizan 45 ó 90 ng de ARN (dependiendo de la expresión basal del gen a amplificar), la enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/ $\mu$ l), SYBR Green PCR master mix, inhibidor de RNasa (20 U/ $\mu$ l), agua DEPC hasta alcanzar un volumen final de 45  $\mu$ l y cebadores en las concentraciones que se detallan en la tabla. Las condiciones para la RT son 30 min a 48° C y 10 min a 95° C para la activación de la enzima ADN polimerasa Taq man. Las condiciones para la PCR son 40 ciclos a 95° C durante 15 seg y 60° C durante 1 min.

Genes		Secuencia 5'-3'	Concentración
VIP	Sentido	ACG TCA CTC AGA TGC AGT CTT CAC	900 nM
	Antisentido	TGC TCC TCT TTC CAT TCA GAA TT	300 nM
VEGF <sub>165</sub>	Sentido	GAC AAG AAA ATC CCT GT GGC	50 nM
	Antisentido	AAC GCG AGT CTG TGT TTT YGC	50 nM
$\beta$ -Actina	Sentido	AGA AGG ATT CCT ATG TGG GCG	300 nM
	Antisentido	CAT GTC GTC CCA GTT GGT GAC	900 nM

Las muestras se analizan por duplicado en placas de 96 pocillos, apropiadas para el sistema de detección de secuencias ABI-Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Una vez terminada la reacción, se obtiene un valor de "Ct", ciclo umbral a partir del cual la amplificación del gen es exponencial. Para normalizar los resultados, se emplea el gen que codifica para  $\beta$ -actina, así los "Ct" reales corresponden a la diferencia con su valor de  $\beta$ -actina lo que corresponde con " $\Delta$ Ct". Para ver la diferencia con respecto al control, se resta el valor de  $\Delta$ Ct del control a todos los demás " $\Delta$ Ct" obteniéndose el valor de " $\Delta\Delta$ Ct". Finalmente los resultados se expresan en forma de " $2^{-\Delta\Delta$ Ct".

### 3.2.1.3 Retrotranscripción de ARN (RT)

La reacción de retrotranscripción se realiza con la enzima transcriptasa reversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) y 2  $\mu$ g de ARN de la muestra que previamente se desnaturaliza. Dicha mezcla contiene:

- Tampón de reacción 5x (Tris-HCl 25mM (pH 8,3), KCl 37,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM)
- Deoxinucleótidos 10  $\mu$ M (dNTPs)
- Transcriptasa reversa MMLV 10 U/ $\mu$ l
- Oligo-dT 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l
- Ditioneitol 5 mM (DTT)
- Inhibidor de RNasa 0,5 U/ $\mu$ l
- Agua DEPC hasta alcanzar un volumen final de 20  $\mu$ l

La reacción se lleva a cabo en un termociclador (MiniCycler™) que se programa a 37 °C durante una hora y posteriormente, 5 min a 95 °C, para conseguir la inactivación de la enzima.



### 3.2.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de 4  $\mu$ l de producto final obtenido en la reacción de retrotranscripción se lleva a cabo la amplificación del DNA utilizando los siguientes reactivos:

- Tampón de reacción 10x (Tris-HCl 75 mM (pH 9), KCl 150mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20 mM,  $\text{MgCl}_2$  2mM)
- dNTPs 10 Mm
- Cebadores específicos del gen a amplificar detallados a continuación en la tabla
- DNA polimerasa recombinante modificada de la homónima de la bacteria *Thermus thermophilus*, 1U/ $\mu$ l
- Agua DEPC hasta alcanzar un volumen final de 30  $\mu$ l.

Genes		Secuencia 5'-3'	Nº de ciclos
VPAC <sub>1</sub>	Sentido	ATG TGC AGA TGA TCG AGG TG	40
	Antisentido	TGT AGC CGG TCT TCA CAG AA	
VPAC <sub>2</sub>	Sentido	TAC AGA GCT TCT GAG GTC TC	40
	Antisentido	TAC TGC AGG AAG ACC AGG C	
VIP	Sentido	ACG TCA CTC AGA TGC AGT CTT CAC	40
	Antisentido	TGC TCC TCT TTC CAT TCA GAA TT	
IL-6	Sentido	CCA GGA GCC CAG CTA TGA ACT	35
	Antisentido	GAG CAG CCC CAG GGA GAA	
STAT3	Sense	AGT GAG TAA GGC TGG GCA GA	35
	Antisense	AAG GCA CCC ACA GAA ACA AC	
p53	Sense	AGG CCT TGG AAC TCA AGC AGG AT	40
	Antisense	TGA GTC AGG CCT TCT GTC T	
$\beta$ -Actina	Sentido	AGA AGG ATT CCT ATG TGG GCG	26
	Antisentido	CAT GTC GTC CCA GTT GGT GAC	

Para la reacción de PCR se emplean las siguientes condiciones de tiempo y temperatura: 5 min a 94 °C y durante el nº de ciclos especificados también en la tabla, 1 min a 95 °C, 1 min a 57 °C, 1 min a 72 °C y 10 min a 72 °C.

La separación de las bandas de amplificación se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y las bandas se visualizan con una tinción con Gel Red™ (Biotium, Hayward, CA, EEUU) y exposición a luz UV (BioRad).

## 3.2.2 Proteínas

### 3.2.2.1 Inmunohistoquímica

Para realizar los ensayos de inmunohistoquímica, el tejido incluido en parafina se corta en secciones de 5-7 µm con un micrótomo MICROM HM 330. Los cortes se montan sobre portaobjetos pretratados con 3-aminopropil-trietoxixilane (TESPA) al 1% en acetona. A continuación se desparafina e rehidrata el tejido. Para exponer los antígenos, los cortes se incuban en tampón citrato 0,01 M (pH 6) durante 2 min en una olla exprés convencional y se dejan enfriar en la olla sin destapar durante 20 min y se lavan durante 5 min con agua destilada. La actividad peroxidasa endógena se inhibe incubando los cortes durante 20 min, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% a T<sup>a</sup> ambiente y se lavan de nuevo 5 min con agua destilada. Se continúa con dos lavados con PBS de 10 min. Las uniones inespecíficas se bloquean al incubar los cortes en TBS con un 3% de NDS y 0,5% de Triton X-100 durante 1 h. Posteriormente, se incuban con el anticuerpo primario diluido en el tampón bloqueo diluido (0,3% NDS y 0,05% tritón X-100), durante toda la noche, siguiendo las siguientes diluciones: VPAC<sub>1</sub> (1-1000); VPAC<sub>2</sub> (1:500); FPRL-1 (1:500).

Las muestras se lavan con TBS durante 10 min, dos veces, y se incuban con el anticuerpo secundario (1:500), 1 h y se vuelven a lavar. Finalmente, los cortes se incuban con el complejo de estreptavidina-biotina peroxidasa diluido en PBS con 0,3% de NDS y 0,05% de Tritón X-100 a T<sup>a</sup> ambiente durante 1 h, se repiten los lavados con TBS y por último, un lavado con agua destilada de 5



min. Para revelar se utiliza diamino-benzidina con el método de intensificación de la glucosa oxidasa. Se comprueba la tinción con el microscopio y, cuando se obtiene una señal intensa, la reacción se detiene con tampón acetato. Por último, se deshidratan, se limpian con xileno y se procede al montaje de la preparación.

### 3.2.2.2 Aislamiento de proteínas totales

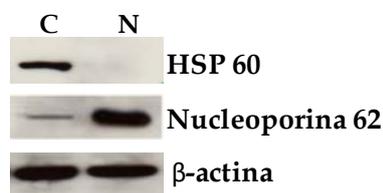
Se siembran 2,5 millones de células/pocillo en placas P-100. Una vez realizados los tratamientos, las células se levantan con un raspador y se centrifugan a 700 xg a 4 °C durante 5 min. Se obtiene un precipitado que se incuba con tampón lisis durante 30 min en hielo, que contiene: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5); 1 mM EDTA; 0,5 M NaCl; 2 mM PMSF; inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina y pepstatina) 5 µg/ml. Tras la incubación, se centrifugan a 4000 xg, 5 min a 4 °C y se recoge el sobrenadante que se guarda a -80 °C para su posterior utilización. La concentración de proteínas obtenida se valora mediante el método de Bradford.

### 3.2.2.3 Aislamiento de citosoles y núcleos

Se siembran 2,5 millones de células/pocillo en placas P-100. Una vez realizados los tratamientos, las células se levantan con un raspador y se centrifugan a 700 xg a 4 °C durante 5 min. A continuación, se utiliza un *kit* comercial NE-PER® *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU).

Una vez eliminado el PBS se añade a cada muestra 100 µl de tampón de extracción citoplasmática I (CER I), y se mantienen a 4° C durante 10 min, con agitación cada 2 min. Pasado este tiempo, se añaden 5,5 µl de tampón de extracción citoplasmática II (CER II), y se incuba a 4° C, durante 1 min. Para separar la fracción citosólica de la nuclear la suspensión de células se centrifuga a 16.000 xg, 5 min a 4° C obteniéndose en el sobrenadante el extracto citosólico. El precipitado se resuspende en 50 µl de tampón de extracción nuclear (NER), y

se incubaba a 4° C durante 40 min, con agitación cada 5-10 min. Tras este periodo, se centrifuga a 16.000 xg, 10 min donde se obtiene el sobrenadante que corresponde con la fracción nuclear. Ambas fracciones se guardan a -80 °C hasta su posterior utilización. La concentración proteica se valora utilizando el método de Bradford. La pureza de ambas fracciones celulares se verificó con el estudio de la expresión nuclear y citosólica mediante inmunodetección, empleando anticuerpos anti-nucleoporina 62 y anti-HSP60, proteínas exclusivas de núcleo y citosol, respectivamente (Fig. 21).



**Figura 21. Método de validación del aislamiento de citosoles (C) y núcleos (N), mediante inmunodetección.** Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

#### 3.2.2.4 Aislamiento de membranas y núcleos

Las células se tripsinizan y se centrifugan a 700 xg durante 5 min. Para realizar este aislamiento, se requiere del uso de tres tampones de lisis:

**Tampón 1** → contiene Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, inhibidores de proteasas, 10 µg/ml de aprotinina, pepstatina A y leupeptina, 2 mM PMSF y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.

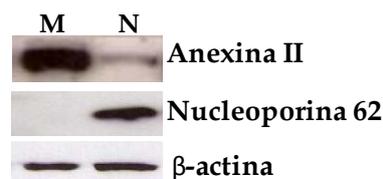
**Tampón 2** → contiene Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 2 mM, inhibidores de proteasas 10 µg/ml de aprotinina, pepstatina A y leupeptina, 2 mM PMSF y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.

**Tampón 3** → contiene Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, 20% de glicerol, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, inhibidores de proteasas 10 µg/ml de aprotinina, pepstatina A y leupeptina, 2 mM PMSF y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.

En primer lugar, se homogeniza la suspensión celular con el tampón 1 realizando 20-40 golpes para facilitar la lisis celular, y se centrifuga a 800 xg durante 20 min precipitando los núcleos. Los extractos que finalmente serán **membranas** corresponden al sobrenadante, se recogen y se vuelven a centrifugar a 800 xg durante 10 min, para eliminar la posible contaminación por núcleos. Finalmente, las membranas celulares se consiguen tras una centrifugación a 100.000 xg durante 20 min. Todo el proceso de aislamiento se realiza a 4°C.

El sedimento que corresponderá a los **núcleos**, se resuspende en tampón 2 durante 10 min, a 4°C y se centrifuga a 17.000 xg, 10 min, a 4°C. El precipitado obtenido se resuspende en tampón 3 durante 30 min, a 4°C. Finalmente, se realiza una última centrifugación a 20.000 xg durante 30 min 4°C, donde se obtiene el sobrenadante que contiene el extracto nuclear.

Ambas fracciones celulares se almacenan a -80°C hasta su uso. La concentración proteica se valora mediante el método de Bradford, y la pureza de ambas fracciones celulares se verificó nuevamente por la expresión de nucleoporina 62 y anexina II, proteínas localizadas exclusivamente en núcleo y membrana respectivamente (Fig. 22).

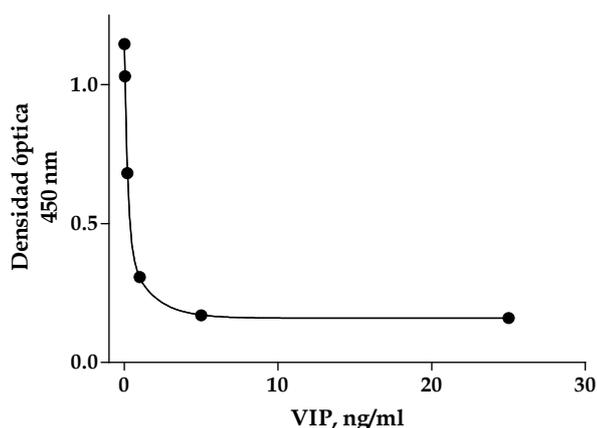


**Figura 22.** Método de validación del aislamiento de membranas (M) y núcleos (N), mediante **inmunodetección**. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

### 3.2.2.5 ELISA para valorar VIP

Para valorar los niveles de VIP citosólicos o del medio extracelular, se utilizan las proteínas citosólicas previamente aisladas y mantenidas a -80° C hasta su utilización, o bien el medio extracelular. Se trata de un ensayo de

competitividad donde las placas P-96 están pre-incubadas con el anticuerpo secundario y previamente bloqueadas, de tal forma que se añade el anticuerpo primario, la muestra problema o las concentraciones conocidas de VIP de la curva patrón y VIP biotinilado que compite con el propio VIP presente en la muestra. Tras 2 h de incubación se lava la placa y se añade estreptavidina conjugada a peroxidasa, que se unirá únicamente a VIP marcado con biotina. Se incuba 1 h y se lava de nuevo, y se añade 3, 3', 5'-tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. De este modo, cuando se añade 2N HCl para detener la reacción 1 hora después, se observa un cambio de color y se mide a 450 nm en un espectrofotómetro. Al ser un ensayo de competición, la cantidad de VIP marcado será inversamente proporcional al valor de absorbancia obtenida (Fig. 23).

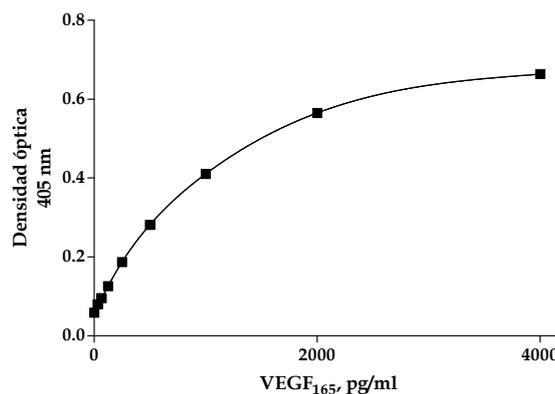


**Figura 23.** Curva patrón representativa, obtenida a partir de concentraciones crecientes de VIP.

### 3.2.2.6 ELISA para valorar VEGF<sub>165</sub>

Se siembran 40-80.000 células/pocillo en placas P-24. Una vez finalizados los diferentes tratamientos, se recoge el medio de cultivo y se procede a cuantificar la isoforma de VEGF<sub>165</sub>. Para ello, se emplea un kit comercial (R&D system), donde se incuba el anticuerpo primario, durante toda la noche a T<sup>a</sup> ambiente, para conseguir su unión a la placa P-96. A continuación se realizan tres lavados con PBS y Tween 20 al 0,05%; los lavados se deben realizar después de cada uno de los pasos del ELISA. A continuación, se procede al

bloqueo de las uniones inespecíficas durante 1 h con BSA al 1% en PBS. Para cuantificar los niveles de expresión se realiza una curva patrón cuyo rango oscila entre 0-4000 pg/ml siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez finalizado el bloqueo y los sucesivos lavados, se añaden las muestras de la curva patrón y las muestras a analizar. Todos los ensayos se realizan por duplicado. Tras 2 h de incubación, se lavan los pocillos y se añade durante otras 2 h el anticuerpo secundario conjugado con biotina para reconocer otro epítipo diferente de VEGF<sub>165</sub>. A continuación, y en ausencia de luz se añade el complejo estreptavidina-peroxidasa durante 20 min. Una vez finalizado este tiempo, se añade la solución sustrato de la enzima peroxidasa durante 1 h, que contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ABTS (2,2'-acínobis-[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]) que permite visualizar la reacción. La absorbancia se mide a 405 nm en un espectofotómetro (Fig. 24).



**Figura 24.** Curva patrón representativa, obtenida a partir de concentraciones crecientes de VEGF<sub>165</sub>.

### 3.2.2.7 Inmunodetección de proteínas

Las proteínas totales aisladas (20-50 µg) mezcladas con tampón de carga (Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), 10% v/v glicerol, 3% SDS w/v, 0,01% azul de bromofenol y β-mercaptoetanol 0,7 M) se desnaturalizan durante 5 min a 95° C. Después, se separan por electroforesis en geles al 8%, 10% ó 12% de acrilamida/bisacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS/PAGE), a T<sup>a</sup> ambiente. Finalmente, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa durante toda la noche, a 4°C y 25 V o a 70 v, durante 3 h. La membrana se incuba 5 min

con una solución con rojo *Ponceau* (TCA 5% y rojo *Ponceau* 0,25%) que nos permite verificar una correcta transferencia de proteínas desde el gel a la membrana. Y se lava para retirar el exceso con PBS.

Para la inmunodetección se realizan los siguientes pasos:

1. Bloqueo de la membrana con TBS (pH 7,6) o PBS, 5 % leche desnatada y 0,05 % Tween-20, para evitar las uniones inespecíficas a la membrana, durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente.
2. Incubación con el anticuerpo primario durante 1-2 h a T<sup>a</sup> ambiente o durante toda la noche a 4 °C.

Anticuerpo	Dilución	Casa Comercial
VPAC <sub>1</sub>	1:10.000	Affinity BioReagents
VPAC <sub>2</sub>	1:1.000	Affinity BioReagents
FPRL-1	1:5.000	Abcam
Anexina-II	1:10.000	BD Bioscience
Nucleoporina p62	1:5.000	BD Bioscience
HSP60	1:2.000	BD Bioscience
p50	1:500	Santa Cruz Biotechnology
STAT3	1:250	Santa Cruz Biotechnology
pSTAT3	1:100	Santa Cruz Biotechnology
p53	1:10.000	Sigma Aldrich
PCNA	1:10.000	Zymed
E-cadherina	1:2.000	BD Bioscience
β-catenina	1:2.000	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-2	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology
Bax	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology
β-actina	1:20.000	Merck



3. Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, 1 h a T<sup>a</sup> ambiente.
4. Incubación con el sustrato de la peroxidasa del reactivo ECL (Amersham Bioscience) durante 1 min.
5. Exposición con películas fotográficas Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL (Amersham Bioscience).
6. El análisis densitométrico de las bandas se realiza con el programa Quantity One (BioRad). Los datos se refieren a la cantidad de  $\beta$ -actina, utilizada como control de carga.

### 3.2.2.8 Inmunocitoquímica

Se siembran 40.000-60.000 células/pocillo sobre cristales tratados y estériles de 12 mm<sup>2</sup>, colocados en placas P-24, y se mantienen 24 h. A continuación, se realizan los diferentes tratamientos y se lavan con PBS. Para fijar las células a los cristales, se utiliza p-formaldehído al 4% (pH 7,4) durante 25 min a T<sup>a</sup> ambiente. Una vez fijadas, se lavan con PBS y se permeabilizan con tritón X-100 al 0,1% durante 10 min a T<sup>a</sup> ambiente. Finalmente se lavan con PBS y se procede a la inmunodetección con los anticuerpos específicos. Las células se someten a un bloqueo con BSA 3% en PBS a 37°C, para prevenir las uniones inespecíficas. Tras el bloqueo, se incuba con el anticuerpo primario durante 2 h, a 37°C, en atmósfera húmeda.

Anticuerpo	Dilución	Casa Comercial
VPAC <sub>1</sub>	1:1.000	Affinity BioReagents
VPAC <sub>2</sub>	1:500	Affinity BioReagents
FPRL-1	1:500	Abcam
p50	1:50	Santa Cruz Biotechnology

Seguidamente, se realizan lavados con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 durante 1 h en oscuridad y en las mismas condiciones que los anticuerpos primarios. A las muestras que se utilizan como control negativo no se les añade el anticuerpo primario. Una vez finalizada la inmunodetección, para su posterior valoración, los cristales se colocan en portaobjetos adheridos con líquido de montaje con DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol; que se une al DNA y tiñe los núcleos) (Fluorsave Reagent<sup>TM</sup>, Invitrogen).

Las preparaciones se visualizan en un microscopio confocal de fluorescencia Leica TCD SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) para su posterior análisis.

### 3.2.3 Determinación de la actividad adenilato ciclasa

La medida de la actividad de la adenilato ciclasa se lleva a cabo cuantificando el AMP cíclico generado tras la incubación con distintas concentraciones de VIP desde  $10^{-5}$  M hasta  $10^{-9}$  M y forskolina desde  $10^{-4}$  M hasta  $10^{-7}$  M, en las dos líneas celulares.

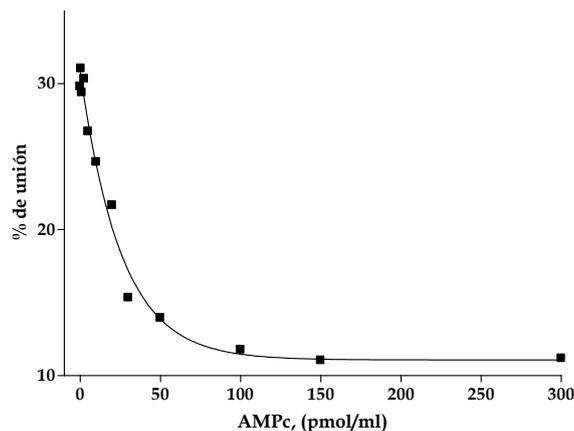
Se siembran 250.000 células/pocillo en placas P6 y se tratan con 750  $\mu$ l de medio sin suero suplementado con 1% de albúmina sérica bovina (BSA), 1 mg/ml de bacitracina, 0,05 mM de fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) y 4 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX).

Tras 15 min de tratamiento, se añaden 250  $\mu$ l de etanol al 70% y se deja evaporar toda la noche. Una vez secas, las muestras se disuelven en 0,2 M tampón fosfato (pH 6,5) y se mantienen a  $-20$  °C.

Para determinar la concentración de AMPc, se incuban 50  $\mu$ l de muestra con proteína kinasa dependiente de AMPc (PKA) 90 min a 4°C, tiempo necesario para que se produzca la unión entre el AMPc y dicha enzima. Tras este periodo se incuba, 2 h a 4°C, con AMPc-<sup>3</sup>H (diluido en 0,05 M tampón fosfato a pH 6,5) para que compita con el AMPc frío producido. Finalmente, se

añade 2,6% de carbón activo diluido en tampón fosfato al 2% de BSA a todos los tubos excepto a los que miden la actividad total. Se centrifuga 5 min a 3000 xg y a 4 °C y se recoge el sobrenadante al que se añade el líquido de centelleo. Posteriormente, se procede a cuantificar la radiactividad en un contador de centelleo líquido ( $\beta$ matic II de Kontron).

La concentración de AMPc generada se obtiene al interpolar los datos obtenidos de la muestra, sobre una curva estándar. Dicha curva, se prepara a partir de concentraciones crecientes de AMPc desde 0 pmol/ml hasta 300 pmol/ml que se diluyen en el tampón fosfato utilizado para diluir las muestras (figura 25).



**Figura 25.** Curva patrón representativa, obtenida a partir de concentraciones crecientes de AMPc.

### 3.2.4 Ensayo de proliferación con timidina tritiada

Se siembran 10.000 células/pocillo en placas P-24 y se mantienen durante 24 h. Antes de realizar el tratamiento se deprivan de suero durante 24 h. Se realizan tratamientos con VIP (0,1  $\mu$ M) con medio sin suero durante 24 h, y 4 h antes de finalizar el tratamiento, se añade timidina tritiada (0,4  $\mu$ Ci/ml). Se lava la placa con PBS y se añade tricloroacético (TCA) 5%, 15 min a 4 °C, para conseguir la precipitación de las proteínas. Se lava con metanol y finalmente las células se resuspenden en 500  $\mu$ l de 0,1 M NaOH y 0,1% SDS. Para medir la

radioactividad se pasa a tubos opacos, se añaden 2,25 ml de líquido de centelleo y finalmente se introduce en un contador de centelleo líquido ( $\beta$ matic II de Kontron).

### 3.2.5 Ensayo de proliferación con bromodesoxiuridina

LA Bromodesodoksiuridina (BrdU), es una uridina derivada que se puede incorporar al DNA en el lugar de la timidina.

Se siembran 75.000 células/pocillo en placas P-24. Una vez adheridas a la placa, las células se deprivan de suero durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, las células se realizan los diferentes pretratamientos y con VIP (0,1  $\mu$ M) en medio sin suero, durante 24 h. Para medir la proliferación se añade bromodesoxiuridina 10  $\mu$ M (BrdU) (BD Bioscience) 1 h antes de finalizar el tratamiento. Posteriormente, las células se lavan con PBS, se levantan con tripsina y se centrifugan a 500 xg durante 5 min, para eliminar el sobrenadante. Las células se fijan con etanol absoluto frío, a -20 ° C, durante 30 min, y transcurrido este tiempo, se centrifugan de nuevo y las células se lavan con PBS.

Para conseguir desnaturalizar el DNA, las células se incuban durante 30 min a T<sup>a</sup> ambiente con HCl 2N. Este paso es imprescindible, ya que el anticuerpo Anti-BrdU se une a las moléculas de BrdU cuando el DNA es de cadena sencilla. Después se centrifugan y se lavan dos veces con PBS y una tercera vez con PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (pH 7,4) y 0,1% de BSA. Finalmente, las células se incuban con 20  $\mu$ l de anti-BrdU anticuerpo monoclonal con FITC (BD Bioscience) en condiciones de oscuridad, durante 30 min como mínimo y después del tiempo de incubación, se repite un último lavado y se centrifugan para separar las células y el sobrenadante. Las células se tiñen con una solución de tinción (PBS, 50 mg/ml de yoduro de propidio (IP) y 10  $\mu$ g/ml de RNasa), antes del análisis por citometría de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson Labware, New Jersey, EEUU). La cantidad DNA que se



distribuye en las diferentes fases del ciclo celular se analiza con el programa Cyflogic v 1.2.1.

### 3.2.6 Ensayo de viabilidad con MTT

El ensayo MTT, es un método basado en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas para reducir la sal de tetrazolio, MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol). Es una sal amarilla y soluble, que se reduce en cristales insolubles de formazán de color azul oscuro retenidos en el interior celular. La cantidad de MTT reducido se puede medir colorimétricamente, presentando su máximo de absorción a 570 nm.

Para realizar el experimento, se siembran 50.000 células/pocillo en placas P-24, y una vez adheridas, se deprivan con medio sin suero durante 24 h. Posteriormente, se realizan los distintos tratamientos, y 1 h antes de finalizar se incuban con 0,3 mg/ml de MTT a 37° C y en condiciones de oscuridad. Los cristales obtenidos se solubilizan con 200-300 µl de isopropanol frío y agitación suave. Una vez homogeneizado, se procede a su lectura en un espectrofotómetro a 570 nm.

### 3.2.7 Unión de Ioduro de Propidio y Anexina V-FITC

Se siembran 75.000-100.000 células/pocillo en placas P-6 que se mantienen durante 24 h. Una vez adheridas, las células se deprivan de suero durante 24 h y transcurrido este tiempo, se realizan los distintos tratamientos. Después, las células se lavan con PBS, se levantan con tripsina y se centrifugan.

Para realizar este ensayo se utilizó un *kit* comercial *Annexin V-FITC apoptosis detection kit* (DB Bioscience, New Jersey, EEUU). Las células se incuban en oscuridad durante 15 min con 5 µl de Anexina V, conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y 5 µl de IP disueltos en tampón de unión (Hepes 0,1 M (pH 7,4), NaCl 1,4 M, CaCl<sub>2</sub> 25 mM). Transcurrido este tiempo, se

añaden 400 µl de tampón de unión y se analizan con el citómetro FACSCalibur. Los resultados obtenidos se analizan con el programa Cyflogic v 1.2.1.

### 3.2.8 Análisis del Ciclo Celular

Se siembran 75.000-100.000 células/pocillo en placas P-6 y se mantienen durante 24 h para conseguir su adherencia, momento en el que se deprivan con medio sin suero durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se realizan los distintos tratamientos y después, las células se lavan con PBS, se levantan con tripsina y se centrifugan. El precipitado de células se fija y se permeabiliza con etanol frío al 70%, durante 30 min a -20° C. Después, las células se centrifugan para retirar el etanol y se lavan con PBS. Finalmente, se resuspenden en una solución de tinción (PBS, 50 mg/ml de ioduro de propidio (IP) y 10 µg/ml de RNasa), antes del análisis por citometría de flujo con FACSCalibur. La cantidad DNA que se distribuye en las diferentes fases del ciclo celular se analiza con el programa Cyflogic v 1.2.1.

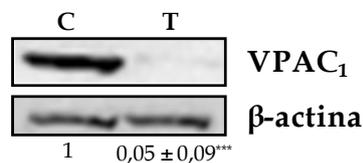
### 3.2.9 Silenciamiento génico del receptor VPAC<sub>1</sub>

Se siembran 150.000 células/pocillo en placas P-6 con medio RPMI suplementado con 10% de suero y carente de antibiótico-antimicótico, que interfiere en el proceso de transfección. Una vez adheridas a la placa, comienza el proceso de transfección mediante la técnica del silenciamiento con ARN de interferencia (ARNi).

Las células se permeabilizan para favorecer la entrada del ARNi con Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen), a las concentraciones recomendadas por el fabricante. Previamente, se debe preparar la mezcla lipofectamina-OPTI-MEM<sup>R</sup>-I (Invitrogen), que se incuba durante 5 min a T<sup>a</sup> ambiente. Después, se añade a la mezcla lipofectamina-OPTI-MEM<sup>R</sup>-I, 100 nM de ARNi o de secuencia “scramble” y se mantiene durante 20 min a T<sup>a</sup> ambiente. La secuencia del ARNi elegida es:

Cebadores	Secuencia (5'-3')
<b>Sentido</b>	GGC UUG UGC AAC AAU AAA U
<b>Antisentido</b>	AUU UAUUGU UGC ACA AGC C

Transcurridas 16 h del tratamiento, se añade a cada pocillo medio EMEM con 5% de suero y se mantienen durante 72 h, tiempo en el que se consigue el máximo silenciamiento de VPAC<sub>1</sub>. Tras este tiempo, se procede a valorar su efecto sobre la proliferación celular con BrdU. Para comprobar la eficacia del silenciamiento se procede al aislamiento de proteínas totales y a la inmunodetección empleando el anticuerpo específico frente a VPAC<sub>1</sub>. En la figura 26 se muestra que tras 72 h de incubación, la expresión de VPAC<sub>1</sub> disminuye significativamente alrededor de un 95%. En esta técnica, se utiliza como control negativo una secuencia de nucleótidos aleatoria (“scramble”), que no debería afectar a la expresión de VPAC<sub>1</sub>.



**Figura 26. Método de validación del silenciamiento génico para VPAC<sub>1</sub> mediante inmunodetección frente a VPAC<sub>1</sub>.** C: control negativo; T: células transfectadas con el ARNi para el receptor VPAC<sub>1</sub>. Los resultados corresponden a la media ± S.E.M., \*\*\* p < 0,001; frente a al control negativo y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

### 3.2.10 Medida de la producción de ROS

Para conocer la producción endógena de ROS celular, se utiliza la sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA (clorometil-2',7'-diclorofluoresceína), ROS Detection Reagents (Molecular Probes, Invitrogen). Se trata de una sonda que difunde en las células, donde sus grupos acetato se escinden por esterasas intracelulares y su grupo reactivo clorometil reacciona con glutatión intracelular y otros tioles. De este modo, se genera una oxidación que da lugar a un producto fluorescente

que permanece en el interior celular y sirve como referencia de la formación de ROS intracelular.

Se siembran 75.000-100.000 células/pocillo en placas P-6 y se mantienen durante 24 h para conseguir su adherencia, momento en el que se deprivan con medio sin suero durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se realizan los distintos tratamientos y después, las células se lavan con PBS, se levantan con tripsina y se centrifugan a 500 xg durante 5 min a 4° C y se mezclan con la sonda de tinción CM-H<sub>2</sub>DCFDA durante 1 hora a 37° C, manteniéndose en condiciones de oscuridad. A continuación, los tubos se centrifugaron y se retira el sobrenadante y finalmente, se resuspenden en una solución de tinción (PBS, 50 mg/ml de ioduro de propidio (IP) y 10 µg/ml de RNasa), antes del análisis por citometría de flujo con FACSCalibur. Como control positivo de la incorporación de la sonda se debe tomar la medida de la autofluorescencia de las propias células sin estar incubadas con la sonda. Los datos obtenidos se procesan con el programa Cyflogic v 1.2.1.

### 3.2.11 Zimografía de gelatina

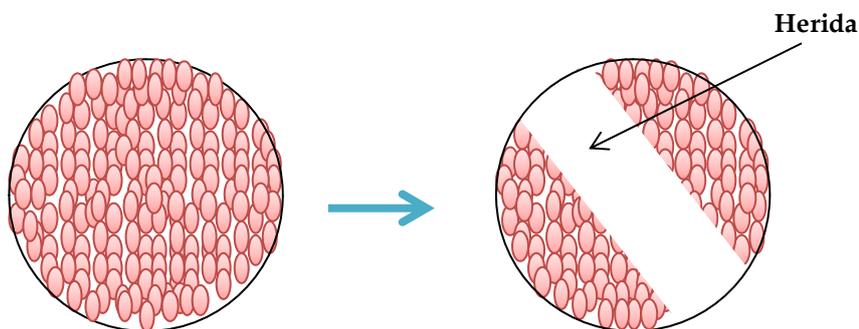
Se siembran 200.000 células/pocillo en placas P-6. Transcurridas 24 h, se les añade medio condicionado y se realizan los diferentes tratamientos. Una vez finalizados, el medio secretado se recoge y se guarda a -80° C hasta su uso.

A continuación, se realiza una electroforesis de acrilamida/bisacrilamida SDS-PAGE con 3 µg de proteínas, cuyo gel se copolimeriza con 0,1 % de gelatina (Sigma Aldrich). Posteriormente, se realizan cuatro lavados del gel para conseguir eliminar el SDS: dos lavados de 30 min cada uno, con Tris- HCl 50 mM (pH 7,4) y 2,5 % de Tritón X-100 y dos lavados de 10 min cada uno, con Tris-HCl 50 mM. Una vez finalizados, el gel se incuba toda la noche a 37° C y en agitación, en un tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 0,15 M, 0,1 % de Tritón X-100 y 0,02% de azida sódica). Después de la incubación, los geles se tiñen durante 30 min con 0,25 % de azul coomasie blue R-250, y se destiñen con la solución de destinción (7,5 % de ácido acético y 20 %

de metanol), apareciendo las bandas blancas sobre un fondo azul, donde las enzimas han degradado la gelatina. El análisis densitométrico de la actividad de las metaloproteasas 2 y 9 se realiza con el programa Quantity One (BioRad).

### 3.2.12 Ensayos de migración

Se basan en un ensayo de cierre de heridas sobre una monocapa de células confluentes. Las células se siembran en placas P-24 y se dejan hasta que alcancen la confluencia, momento en el que se llevan a cabo los diferentes tratamientos. La herida se realiza mediante una incisión con un raspador manual. Para valorar la migración celular, se realizan fotos sucesivas de la herida, en un microscopio invertido acoplado a una cámara Nikon (40x). El seguimiento se distribuye en diferentes tiempos (0-24 h), hasta conseguir el cierre completo de la sección y los valores se miden con respecto al tiempo cero de cada tratamiento.



### 3.2.13 Ensayos de invasión, adhesión y migración hacia hueso

Antes de realizar estos ensayos, las células se deprivan de suero durante 24 h. Posteriormente, se levantan por tripsinización y la enzima se neutraliza con medio sin suero suplementado con 0,1% de inhibidor de tripsina. Las células se centrifugan a 700 xg, durante 5 min y se resuspenden en medio sin suero suplementado con 0,1% de BSA, hasta alcanzar una dilución de 250.000

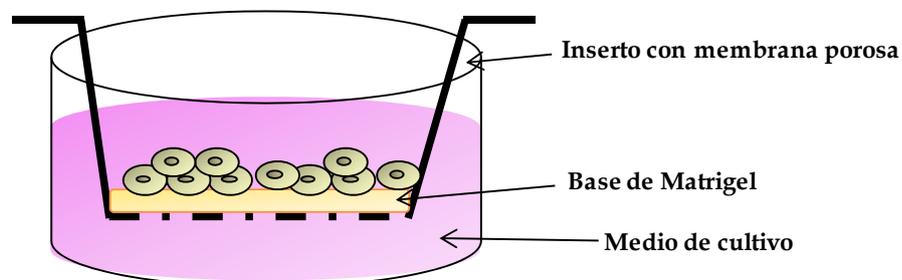
células/ml. La dilución de células se debe mantener en suspensión, durante 1 h, antes de realizar los diferentes tratamientos.

### ➤ Adhesión

La suspensión de células se separa en varias fracciones que dependerán del número de tratamientos a realizar y se mantienen en suspensión durante 1 h a 37° C con agitaciones cada 5 min. Por otro lado, se deben preparar las placas con el colágeno que actúa como matriz. Para ello, se añaden 100 µl de colágeno tipo I (8 µg/cm<sup>2</sup>) diluido en ácido acético 10 mM/pocillo, en placas P-96, durante 1 h a 37°C en atmósfera seca para conseguir una fijación completa al pocillo. Pasado ese tiempo, se aspira el colágeno y se lava dos veces la placa con PBS. A cada pocillo se adicionan 100 µl de la suspensión celular previamente tratada y se aspira el medio en el tiempo correspondiente. Finalmente, se continúa la valoración de las células adheridas al colágeno mediante un ensayo de MTT, donde se añaden 100 µl de medio sin suero y 0,3 mg/ml MTT a cada pocillo.

### ➤ Invasión

Antes de añadir la suspensión celular, se debe preparar la cámara “Transwell” óptima para realizar este tipo de ensayos. Se coloca en cada pocillo de una placa P-24 donde se añade 50 µl Matrigel/pocillo (diluido 1/10) y se mantiene durante 3 h, a 37° C.



**Cámara Transwell**



Una vez que ha solidificado, se añaden 200  $\mu$ l de la dilución de células en la parte superior del inserto y 600  $\mu$ l de medio con suero en la parte inferior, dentro del pocillo de la placa P-24. La suspensión celular se incuba durante 24 h a 37° C. Una vez finalizado el periodo de incubación, se aspira el medio y las células que han atravesado la membrana porosa, se fijan durante 6 min con metanol. Se tiñen 7 minutos, con hematoxilina de Mayer y el exceso se elimina con PBS. Para visualizar las células, se limpia la parte superior del inserto con la ayuda de un hisopo. Los pocillos se dejan secar y se realizan fotografías a diferentes campos escogidos al azar para proceder a su contaje.

### ➤ Migración hacia hueso

Es un ensayo para el que se utiliza nuevamente la cámara “Transwell” a la que se añaden 200  $\mu$ l de la dilución de las células en la parte superior de cada inserto y, en la placa P-24 se añaden 600  $\mu$ l de medio sin suero suplementado 5 ng/ml de colágeno tipo 1 de hueso, que sirve como quimioatrayente para las células. Y se incuban durante 24 h a 37°C. Finalizado este tiempo, se aspira el medio y se fijan las células durante 6 min con metanol, se tiñen 7 min con hematoxilina de Mayer y se elimina el exceso lavando con PBS. Los pocillos se dejan secar, se observan al microscopio y se fotografían diferentes campos elegidos al azar para proceder a contar el número de células que han migrado hacia el medio con colágeno.

### **3.2.14 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizan con el programa GraphPad Prism, utilizando el test de Bonferroni para comparaciones múltiples después de realizar un análisis de varianza (ANOVA). El resultado obtenido se considera significativo a partir de  $p < 0,05$ .



## **4. Resultados**





## 4.1. ESTUDIO DEL SISTEMA VIP-RECEPTOR EN RIÑÓN

Los mecanismos de activación de VIP en riñón son, hasta el momento, desconocidos. En este apartado se aborda el análisis de los receptores así como de los efectores de VIP en riñón.

### 4.1.1. Estudio comparativo del sistema VIP-VPAC<sub>1/2</sub>/FPRL-1 en tejido humano de riñón tumoral y no tumoral

En este primer bloque de resultados se plantea el estudio de la expresión de VIP y sus receptores en muestras de carcinoma de células renales humanas, así como en muestras de tejido renal no tumoral. Estas muestras proceden de 17 pacientes sometidos a nefrectomías parciales o radicales por diagnóstico de CCR y obtenidas gracias a la colaboración con los Servicios de Anatomía Patológica y Urología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Los aspectos clinicopatológicos más relevantes de los pacientes se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6:** Características clinicopatológicas de los pacientes analizados.

Paciente	Sexo	Edad	CCR	Grado	Infiltración Neoplásica
1	V	74	Papilar	II	Sí
2	V	75	Células claras	II	Sí
3	M	42	Papilar	I	No
4	V	78	Células claras	III	Sí
5	M	52	Papilar	I	No
6	V	75	Células claras	II	No
7	M	51	Células claras	I	No
8	V	45	Células claras	III	No
9	M	71	Papilar	II	Sí
10	V	63	Papilar	I	Sí
11	M	79	Células claras	III	No
12	V	54	Células claras	II	Sí
13	V	65	Papilar II	III	Sí
14	V	67	Células claras	III	No
15	V	70	Papilar	II	No
16	M	53	Papilar	I	No
17	V	52	Células claras	III	Sí

#### 4.1.1.1. Expresión de VIP

Se realizaron diferentes ensayos para conocer y comparar la expresión del neuropéptido en las muestras de tejido fresco tumoral y no tumoral del mismo paciente.

##### 4.1.1.1.1. Cuantificación de los niveles de ARNm de VIP

Para conocer la expresión del mensajero de VIP en las muestras recogidas se procede a la extracción del ARN total y se somete a RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCRQ) utilizando cebadores específicos.

En la tabla 7, se muestra el incremento de Ct ( $\Delta Ct$ ) de las muestras analizadas. El ciclo umbral (Ct), a partir del cual el número de copias del gen aumenta de manera exponencial, presenta un valor diferente dependiendo del tipo de CCR. En primer lugar, se analiza el  $\Delta Ct$  de las muestras no tumorales y tumorales de los pacientes que presentan CCR de células claras. Para casi todas las muestras analizadas (pacientes 4, 6, 7, 8, 11, 14, 17), el valor es menor en el tejido tumoral que en el no tumoral. Esto indica que las células tumorales necesitan más ciclos ( $3,15 \pm 0,85^{**}$ ) que las del tejido no tumoral para que la expresión de VIP comience a aumentar de manera exponencial, y por lo tanto, estará significativamente menos expresado. Además, esta diferencia se hace más patente si los pacientes se encuentran en el grado III de la enfermedad (pacientes 4, 6, 11, 14, 17). En segundo lugar, se analizan las muestras de los pacientes con CCR de tipo papilar. En este caso, como se puede observar en la tabla 7, no aparece un patrón definido para la expresión de VIP, ya que presenta un número de ciclos muy similar en ambos tejidos ( $0,06 \pm 1,3$ ).

**Tabla 7:** Valores de  $\Delta Ct$  en la amplificación del ARNm para VIP.

$\Delta Ct$							
CCR de células claras				CCR papilar			
Nº Pac.	No tumor	Tumor	$\Delta Ct$	Nº Pac.	No tumor	Tumor	$\Delta Ct$
2	5,41	7,89	<b>-2,48</b>	1	11,94	14,04	<b>-2,1</b>
4	9,07	7,18	<b>1,89</b>	3	10,09	9,31	<b>0,78</b>
6	8,79	6,77	<b>2,02</b>	5	-	ND	-
7	8,11	5,89	<b>2,22</b>	9	9,25	6,94	<b>2,31</b>
8	8,96	5,37	<b>3,59</b>	10	10,61	9,2	<b>1,41</b>
11	3,73	1,03	<b>2,7</b>	13	8,79	7,81	<b>0,98</b>
12	8,22	9,23	<b>-1,01</b>	15	6,68	9,8	<b>-3,12</b>
14	9,29	3,26	<b>6,03</b>	16	5,85	5,7	<b>0,15</b>
17	12,25	8,08	<b>4,17</b>				

ND: no determinado. **Color azulado:** grado III.

#### 4.1.1.1.2. Cuantificación de los niveles citosólicos de VIP

Una vez valorada la expresión del mensajero, se procede al análisis mediante ELISA de los niveles del neuropeptido en los extractos citosólicos obtenidos a partir de las muestras de tejido tumoral y no tumoral. En la tabla 8 se muestran los valores de VIP en pg VIP/mg de proteína, en las muestras de CCR de células claras (derecha) y de tipo papilar (izquierda). Los resultados indican que la expresión de VIP citosólico varía en función del tipo de carcinoma al igual que ocurría con los resultados obtenidos del ARNm. En las muestras de pacientes con CCR de células claras (pacientes 2, 4, 6, 7, 8, 11, 14, 17), el contenido citosólico de VIP es significativamente menor ( $2,4 \text{ pg} \pm 0,72^{**}$ ) en las muestras tumorales en comparación con el tejido no tumoral. Si analizamos los pg de VIP expresados individualmente, se puede observar que para los pacientes de grado III (pacientes 4, 6, 11, 14, 17), existe una mayor diferencia de expresión de VIP entre el tejido no tumoral y el tumoral. El análisis de las muestras de CCR papilar (1, 5, 9, 10, 13) indica que, al igual que ocurría con el mensajero de VIP, no se observan diferencias significativas en la expresión de VIP citosólico entre ambos tejidos ( $1,64 \text{ pg} \pm 3,43$ ).

**Tabla 8:** Concentraciones de VIP en muestras de tejido fresco.

Pg VIP/mg proteína					
CCR de células claras			CCR papilar		
Paciente	No tumor	Tumor	Paciente	No tumor	Tumor
2	5,09	2,9	1	17,35	19,09
4	3,36	0,34	3	0,25	4,55
6	3,62	1,44	5	ND	ND
7	5,49	0,75	9	0,94	1,01
8	3,53	0,64	10	3,6	0,79
11	6,51	1,68	13	0,71	5,54
12	8,22	9,23	15	ND	2,02
14	1,40	0,32	16	ND	1,39
17	1,16	0,39			

ND: no detectado. **Color azulado:** grado III.

#### 4.1.1.2. Estudio de los receptores de VIP

Tras analizar los niveles de expresión del neuropéptido en las muestras de tejido renal humano, se procede al estudio de los niveles de expresión de sus receptores. Como se ha mencionado en la introducción, el CCR de células claras es en la actualidad el que presenta la incidencia más elevada, lo que nos llevó a elegir para este estudio muestras incluidas en parafina, casi en su totalidad procedentes de pacientes con CCR de células claras. La tabla 9 muestra las características clínico-patológicas de los 39 pacientes analizados.

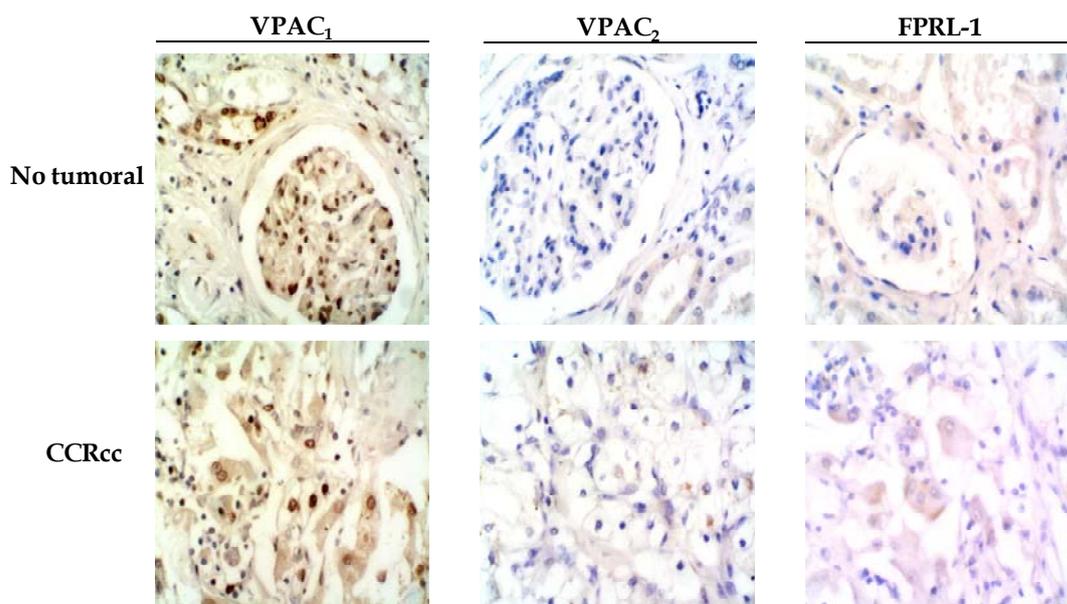
**Tabla 9:** Características clínico-patológicas de los pacientes analizados.

Parámetros clínicos		n	Parámetros clínicos		n
Edad	< 50 años	14	Sexo	Varón	30
	> 50 años	25		Mujer	9
Histología	Células claras	37	Grado	I	5
	Papilar	1		II	16
	Cromóforo	1		III	14
				IV	3
Infiltración	Positivo	11			
	Negativo	28			

#### 4.1.1.2.1. Inmunodetección de VPAC<sub>1/2</sub>/FPRL-1 en cortes histológicos

Se procedió a la detección por inmunohistoquímica sobre secciones de tejido renal humano incluido en parafina, proporcionadas por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Príncipe de Asturias.

El empleo de anticuerpos específicos frente a los diferentes receptores proporciona señales con mayor o menor grado de intensidad, directamente correlacionado con el grado de expresión de los receptores en el tejido renal. La figura 27 corresponde a fotografías de parénquima renal no tumoral y de CCR de células claras representativas de los ensayos realizados con los anticuerpos frente a VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub> y FPRL-1. Los niveles de receptores VPAC<sub>1</sub> se han detectado en todas las muestras analizadas, observándose un patrón de localización común a nivel nuclear (núcleo teñido de azul), sin manifestar diferencias en la expresión entre ambos tejidos (Fig. 27). El análisis del receptor VPAC<sub>2</sub> indica que no existe expresión en ninguna de las muestras con carcinoma. Se ha observado una expresión muy débil únicamente en dos muestras de tejido normal, pero esa tinción no corresponde con los túbulos proximales. El análisis de la expresión del receptor FPRL-1 revela que todas las muestras analizadas son negativas.



**Figura 27.** Expresión de los receptores VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub> y FPRL-1 mediante inmunohistoquímica. Microfotografías de muestras de parénquima renal no tumoral y de CCR de células claras. Tinción nuclear con hematoxilina de Carazzi.

#### 4.1.2. Estudio del sistema VIP-VPAC<sub>1/2</sub>/FPRL-1 en células renales

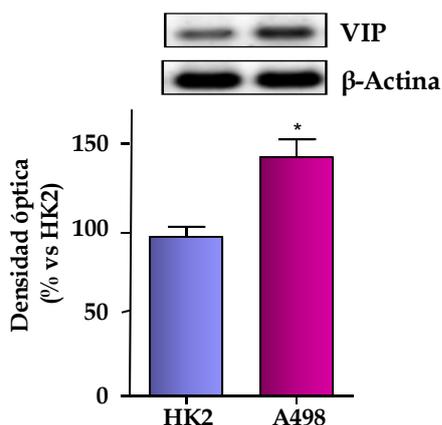
Además de valorar el sistema VIP-VPAC<sub>1/2</sub>/FPRL-1 en las muestras de tejido de pacientes, se procedió a realizar un análisis más profundo en células renales tubulares en cultivo, representativas de un estado tumoral y no tumoral. Se seleccionaron dos líneas celulares: HK2, línea celular de epitelio de túbulo proximal humano, y A498, línea celular de carcinoma de células claras de CCR. En primer lugar, en este apartado se valora la expresión de VIP y de sus receptores (VPAC<sub>1/2</sub> y FPRL-1), en ambas líneas celulares, así como la funcionalidad de los mismos. Se estudia también el posible efecto regulador de VIP sobre su propio sistema.

##### 4.1.2.1. Expresión de VIP

En este apartado se aborda el análisis de la expresión del neuropéptido mediante el estudio de la expresión del mensajero por RT-PCR como del péptido por inmunodetección.

##### 4.1.2.1.1. Cuantificación de los niveles de ARNm de VIP

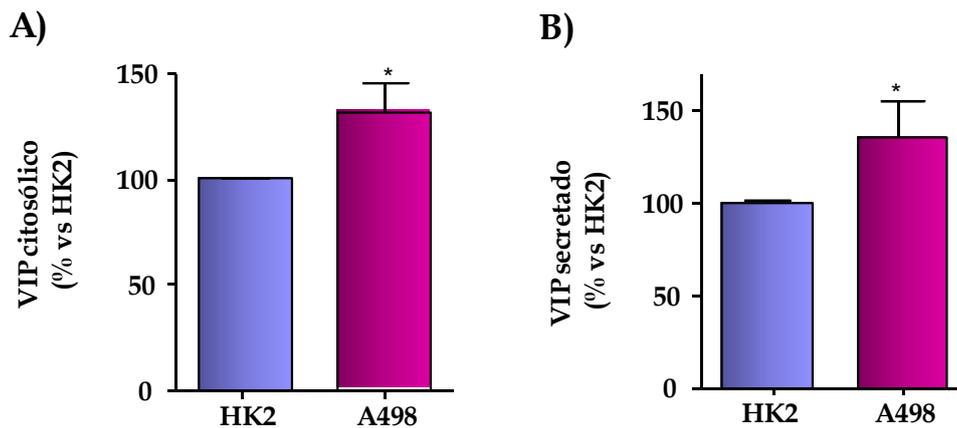
Para valorar los niveles de expresión génica de VIP se realizan ensayos de RT-PCR en ambas líneas celulares. Una vez aislado el ARN total celular, se retrotranscribe y se amplifica utilizando cebadores específicos. En la figura 28 se observa que en ambas líneas celulares se expresan niveles detectables del mensajero de VIP amplificándose un solo producto de 101 pb. Como control interno se utiliza el gen de  $\beta$ -actina. Los resultados de la densitometría de las bandas obtenidas muestran que en las células A498 hay un 40% más de expresión génica de VIP que en la línea celular HK2.



**Figura 28:** Expresión del ARNm de VIP en células HK2 y A498, medido por RT-PCR. El resultado se normaliza con el ARNm de  $\beta$ -actina. Se muestran los valores de la media  $\pm$  E.S.M., de tres experimentos, \*  $p < 0,05$  frente a los valores de la línea celular HK2.

#### 4.1.2.1.2. Niveles citosólicos y secretados de VIP

A continuación, se cuantifican los niveles citosólicos y secretados de VIP mediante ensayos de ELISA. La línea celular A498 muestra niveles significativamente más elevados del neuropéptido en el citosol (Fig. 29A) y una mayor secreción de VIP al medio extracelular (Fig. 29B) respecto a los valores obtenidos en la línea celular HK2.



**Figura 29:** Niveles citosólicos (A) y secretados de VIP tras 8 h (B) valoradas mediante ELISA. Los resultados se muestran en porcentaje frente a las células control HK2. Se muestran los valores de la media  $\pm$  E.S.M., de tres experimentos, \*  $p < 0,05$  frente a los valores de la línea celular HK2.

#### 4.1.2.2. Expresión de los receptores de VIP

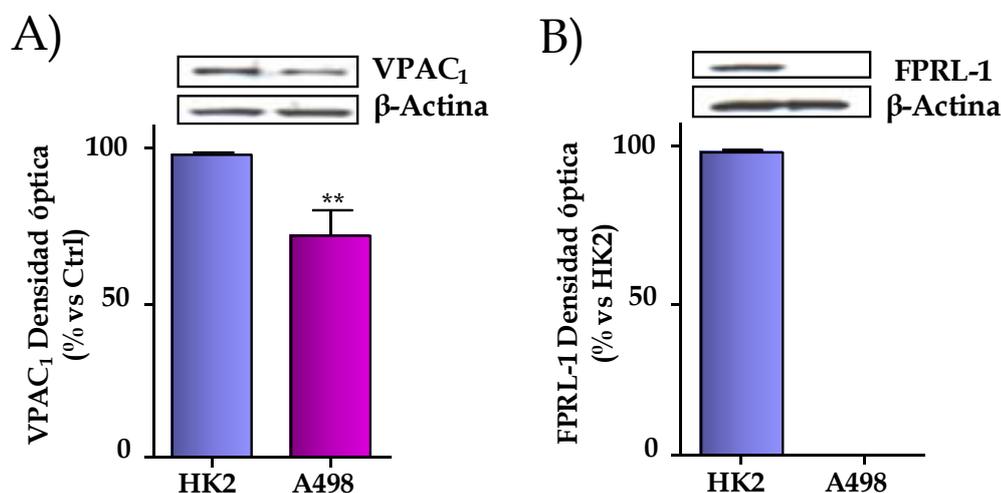
Una vez demostrada la expresión de VIP en las dos líneas celulares, nos propusimos hacer lo mismo con sus receptores. Para ello, se valora y cuantifica la expresión y localización celular de VPAC<sub>1/2</sub> y FPRL-1.

##### 4.1.2.2.1. Expresión de los receptores de VIP

Con el fin de estudiar y comparar la localización de los receptores de VIP, se realizan ensayos inmunocitoquímicos y de “western blot” utilizando anticuerpos específicos para los receptores VPAC<sub>1/2</sub>, PAC<sub>1</sub> y FPRL-1.

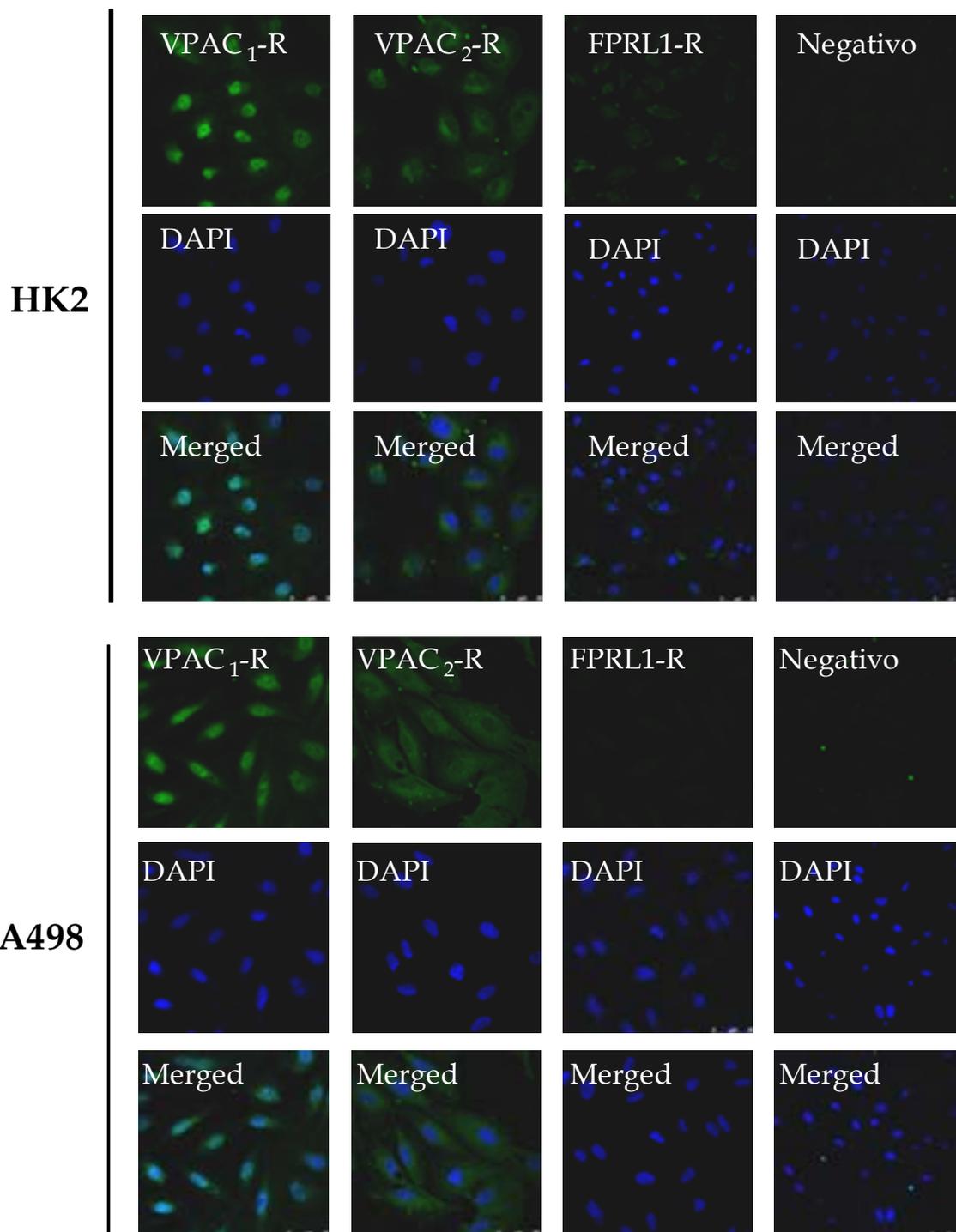
En primer lugar se analiza la expresión de los receptores VPAC<sub>1</sub> y FPRL-1 mediante “western blot” ya que bajo nuestras condiciones experimentales no ha sido posible detectar VPAC<sub>2</sub>. En la figura 30 se observan niveles de expresión del

receptor VPAC<sub>1</sub> más elevados en HK2 que en A498. Para el receptor FPRL-1 el resultado es llamativo, ya que no se expresa en las células tumorales sino que únicamente aparece en la línea celular control.



**Figura 30:** Expresión de los receptores VPAC<sub>1</sub> (A) y FPRL-1 (B) medidos por “western blot”. Los resultados se muestran como el porcentaje de la expresión con respecto a la línea celular HK2. Los datos corresponden a la media ± E.S.M., de diez experimentos independientes, \*\* p < 0,01 frente a los valores de las células HK2.

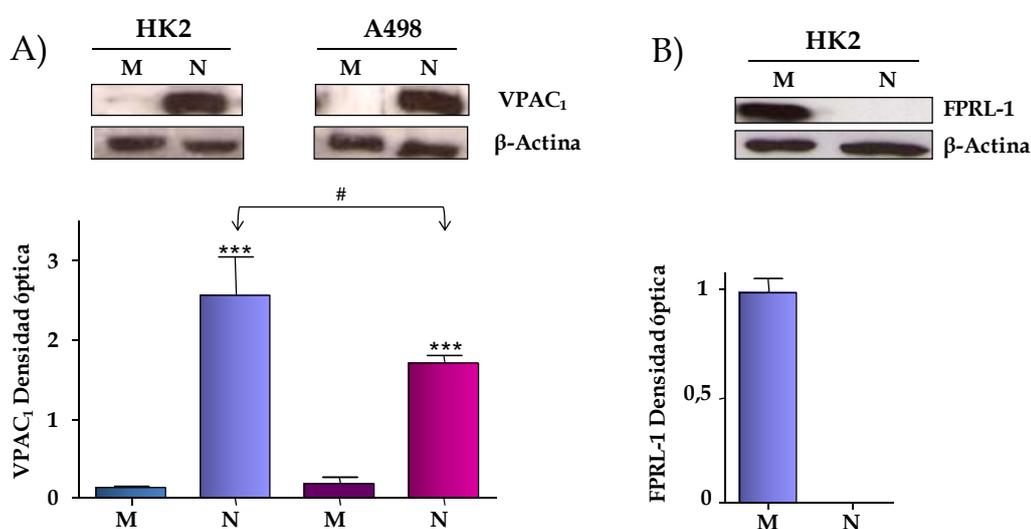
En segundo lugar, para precisar la localización de los receptores se realizan ensayos de inmunocitoquímica. En la figura 31 se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. El receptor VPAC<sub>1</sub> está altamente expresado en ambas líneas celulares siendo su localización mayoritariamente nuclear, coincidiendo la mayor intensidad de fluorescencia con los núcleos marcados con DAPI. El receptor VPAC<sub>2</sub> tiene una expresión mucho más débil que VPAC<sub>1</sub>, y se localiza en la zona perinuclear de las dos líneas celulares. Estos hechos no descartan su presencia en membrana plasmática al observarse una tinción general en dicha localización. En cambio, el receptor FPRL-1 solamente se expresa en membranas de HK2 estando totalmente ausente en A498, de igual forma que lo observado por “western blot”.



**Figura 31:** Inmunocitoquímica de los receptores VPAC<sub>1/2</sub>, PAC<sub>1</sub> y FPRL-1 en las líneas celulares HK2 y A498. Todas las muestras están realizadas con el marcaje de núcleos DAPI. Como control negativo se realizan preparaciones en ausencia de anticuerpo primario. Las imágenes son representativas de cinco experimentos independientes.

#### 4.1.2.2. Estudio de los receptores de VIP en fracciones subcelulares

Para confirmar y cuantificar la compartimentación celular de los dos receptores más expresados, VPAC<sub>1</sub> y FPRL-1, se procede al aislamiento de membranas y núcleos de ambas líneas celulares. Mediante “western blot” se analiza cada fracción celular, donde se puede observar la expresión nuclear del receptor VPAC<sub>1</sub> en las dos líneas celulares (Fig. 32A). El receptor FPRL-1 en la línea celular HK2 presenta una localización exclusiva en la membrana celular (Fig. 32B). Se corroboran así los resultados obtenidos por inmunofluorescencia.

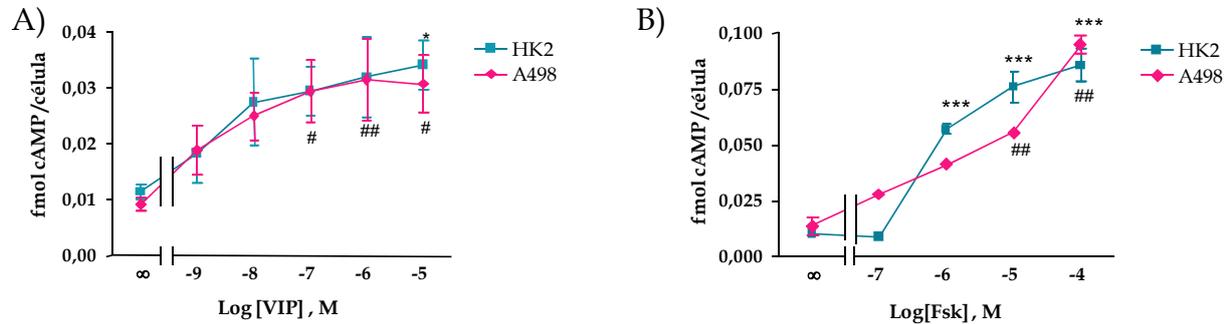


**Figura 32:** Expresión de VPAC<sub>1</sub> (A) y FPRL-1 (B) en membranas y núcleos de células HK2 y A498 medidos por “western blot”. Se representan los valores de expresión de los receptores en membranas (M) frente a núcleos (N). Los datos corresponden a la media ± E.S.M. de tres experimentos independientes, \*\*\* p < 0,001 frente a M y # p < 0,05 frente a N de HK2.

#### 4.1.2.3. Funcionalidad de los receptores de VIP

Una vez caracterizado el sistema de VIP, se analiza la funcionalidad de los receptores en ambas líneas celulares mediante el estudio de uno de los principales efectores de los receptores de VIP, la enzima adenilato ciclasa. La figura 33A muestra las curvas dosis-efecto en las que se observa que el tratamiento con VIP provoca una respuesta de síntesis de AMPc creciente a medida que aumenta la concentración del neuropéptido, alcanzando unos niveles máximos de AMPc muy

similares en los dos tipos celulares. Se utiliza forskolina como control positivo de la estimulación directa de la adenilato ciclasa (B).

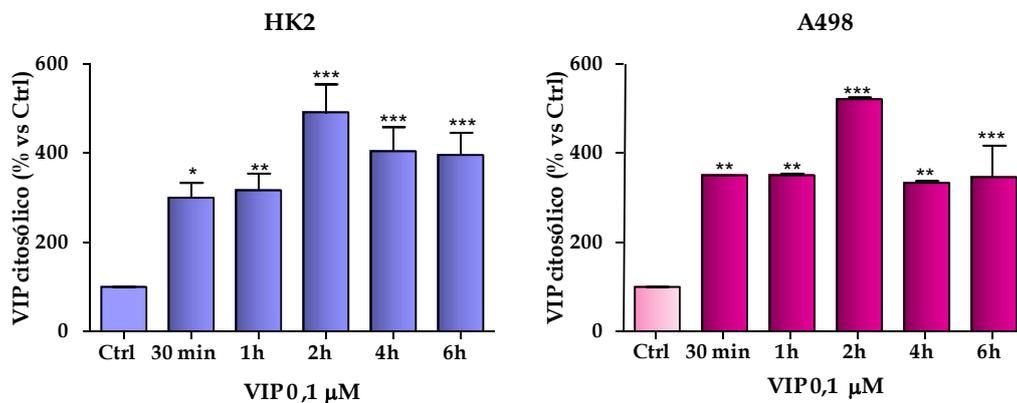


**Figura 33: Actividad de la adenilato ciclasa** tras la estimulación con concentraciones crecientes de VIP (A) y de forskolina (B). Los resultados se representan como fmol de AMPc producidos por célula. Los valores son la media  $\pm$  E.S.M. de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado, \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control en HK2 y #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  frente al control de A498.

#### 4.1.2.4. Efecto de VIP sobre su expresión y la de sus receptores

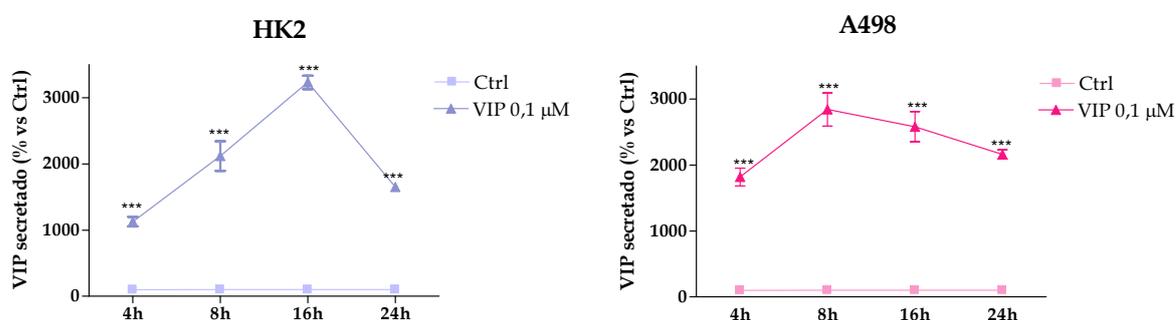
##### 4.1.2.4.1. Efecto de VIP sobre su propia expresión y secreción

Tras la incubación de las células con 0,1  $\mu$ M VIP, a diferentes tiempos, se valoran los niveles citosólicos y secretados del neuropéptido mediante ensayos de ELISA. En la figura 34 se observa que a los 30 min de incubación con VIP hay un incremento significativo de los niveles citosólicos de VIP en ambas células.



**Figura 34: Niveles citosólicos de VIP, valorados mediante ELISA, tras el tratamiento con el neuropéptido (0,1  $\mu$ M) a diferentes tiempos.** Los valores se expresan en porcentaje respecto a su control y corresponden a la media  $\pm$  E.S.M. de tres experimentos independientes, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control.

El análisis de los niveles de péptido en el medio extracelular muestra que el tratamiento con VIP exógeno produce también un aumento de su secreción a todos los tiempos estudiados, para ambas líneas celulares (Figura 35). En células HK2 se puede observar un pico de secreción, a las 16 h de tratamiento con VIP, y en células A498, a las 8h. Además, los niveles que se consiguen de VIP en el medio extracelular en células A498 duplican a los encontrados en células HK2 a tan solo 4h. Estos resultados revelan que VIP regula de manera autocrina/intracrina, su propia síntesis y secreción.

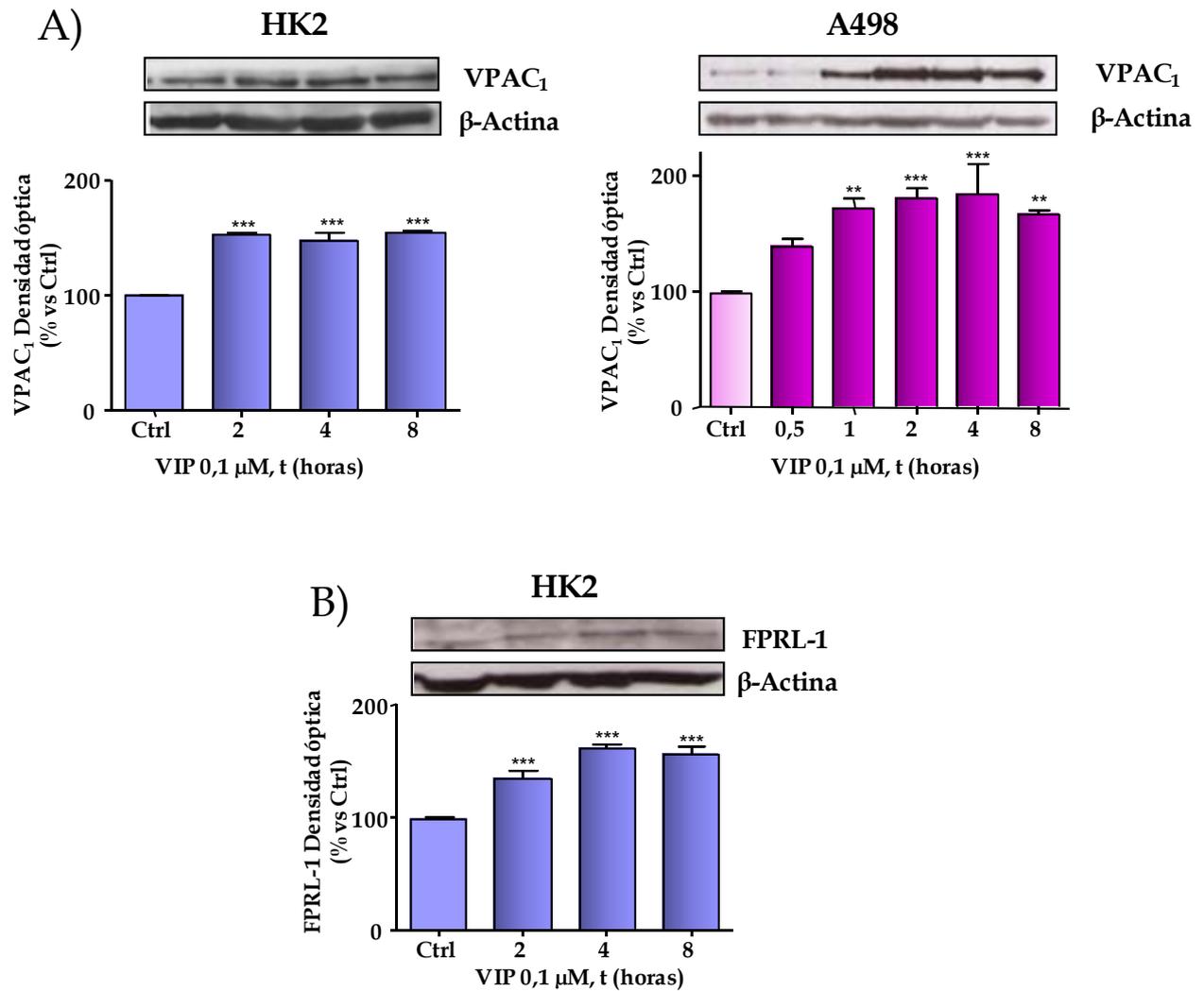


**Figura 35: Niveles secretados de VIP valorados por ensayos de ELISA.** Las células fueron tratadas con 0,1 μM de VIP a diferentes tiempos. Los resultados se muestran como porcentaje respecto a su control. Los valores corresponden a la media ± E.S.M., de 3 experimentos independientes, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  frente al control.

#### 4.1.2.4.2. Efecto de VIP sobre la expresión de los receptores VPAC<sub>1</sub>/FPRL-1

Una vez demostrado que VIP estimula su propia síntesis y secreción se procede a valorar si los niveles de expresión de sus receptores se modifican tras la estimulación con el neuropéptido. Para ello se realizan ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos, valorando la expresión del receptor VPAC<sub>1</sub> en ambas líneas celulares y la expresión de FPRL-1 solo en la línea celular HK2. En la figura 36 se muestra el efecto del tratamiento con VIP sobre los niveles de expresión de los receptores a diferentes tiempos. La expresión de VPAC<sub>1</sub> (Fig. 36A) se incrementa significativamente tras el estímulo de 2 h con el neuropéptido en ambas líneas celulares, y se mantiene a lo largo del tiempo, pero es más temprano y elevado en células A498, ya que esta diferencia aparece a tan solo 1 h. Para el receptor FPRL-1

(Fig. 36B) se observa que el tratamiento con VIP también produce un incremento significativo de su expresión, y nuevamente se mantiene a lo largo del tiempo.



**Figura 36:** Niveles de expresión de VPAC<sub>1</sub> (A) y FPRL-1 (B) incubados con VIP a diferentes tiempos, mediante "western blot". Los resultados se muestran como el porcentaje de la expresión frente al control y se utiliza β-actina como control de carga. Los datos corresponden a la media ± E.S.M. de tres experimentos independientes, \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 frente a su control.

## 4.2. IMPLICACIÓN DE VIP EN LA REGULACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE PROMUEVEN LA ONCOGÉNESIS

Los factores de transcripción NFkB y STAT3 están considerados como atractivas dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer. Por esta razón, nos propusimos valorar el posible efecto del VIP en la activación de ambas moléculas. En este bloque de resultados se analiza en primer lugar el efecto de VIP sobre la translocación nuclear de NFkB y la activación por fosforilación de STAT3. A continuación, se estudia, además, la implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en este efecto, utilizando el antagonista selectivo JV-1-53.

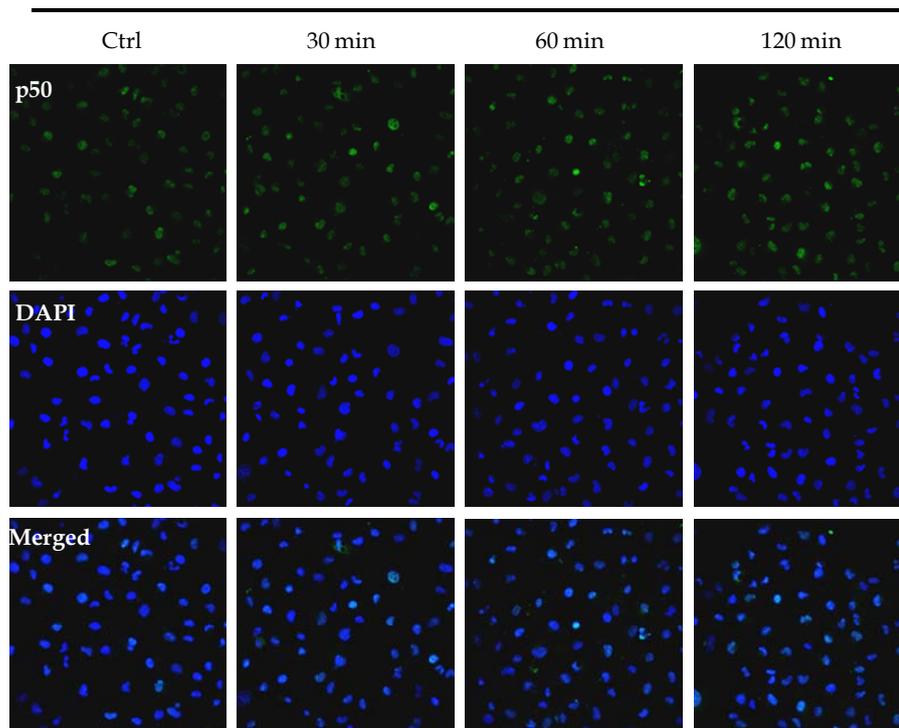
### 4.2.1. Efecto de VIP en la activación de NFkB

Para conocer si VIP regula la activación del factor de transcripción NFkB se realizan ensayos de inmunodetección de la subunidad p50 en citosol y núcleo para valorar así la posible translocación nuclear, como medida de su activación. Estos mismos ensayos se realizan con el antagonista selectivo, JV-1-53, con el fin de relacionar la posible translocación, con los receptores VPAC<sub>1/2</sub>.

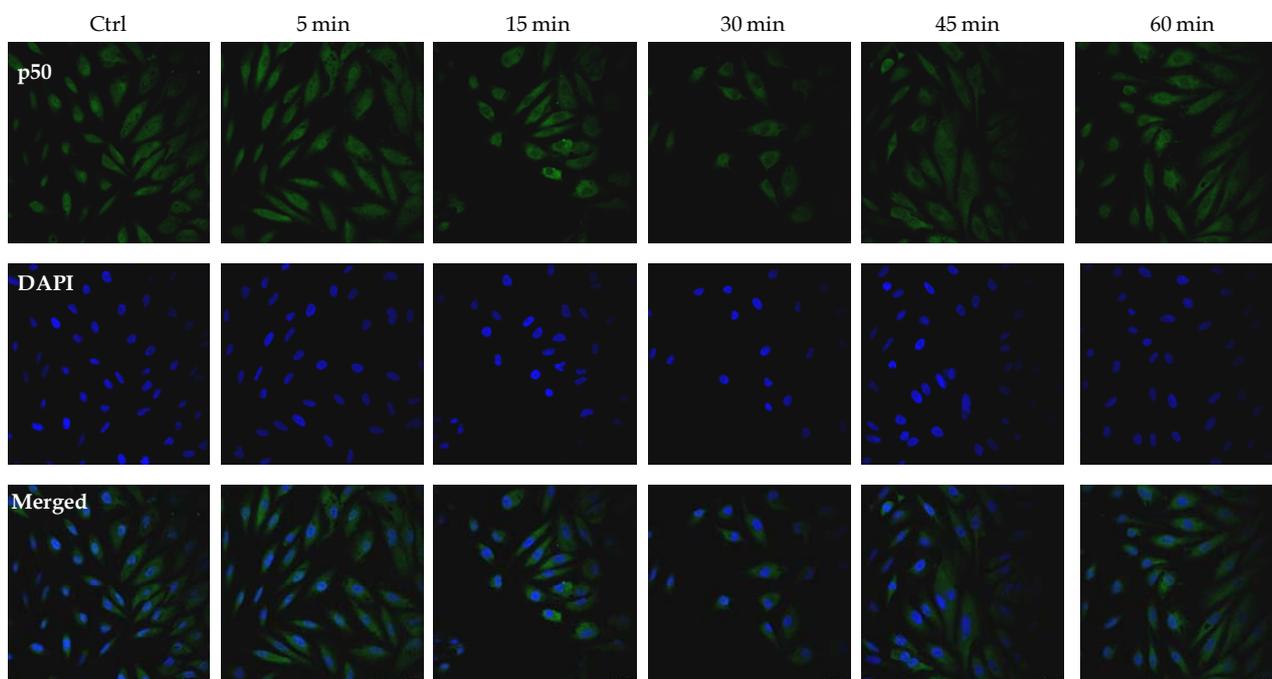
#### 4.2.1.1. Efecto de VIP en la expresión de p50

En ambas líneas celulares, tratadas con 1  $\mu$ M VIP a diferentes tiempos, se realizan ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos, para conocer la expresión y localización de p50. Como se observa en las fotografías realizadas con el microscopio de fluorescencia (Fig. 37), así como en los inmunoblots (Fig. 38), la localización de p50 es nuclear en las dos líneas celulares. En las células tumorales, VIP produce una disminución del contenido nuclear de p50 en tan solo 15 min de tratamiento, y este efecto se mantiene al menos 1 h (Fig. 37). Como se muestra en la figura 38, esta disminución se correlaciona con la acumulación citosólica de p50 en A498. En cambio, VIP no modifica los niveles de p50 nucleares en la línea celular no tumoral, en los tiempos analizados.

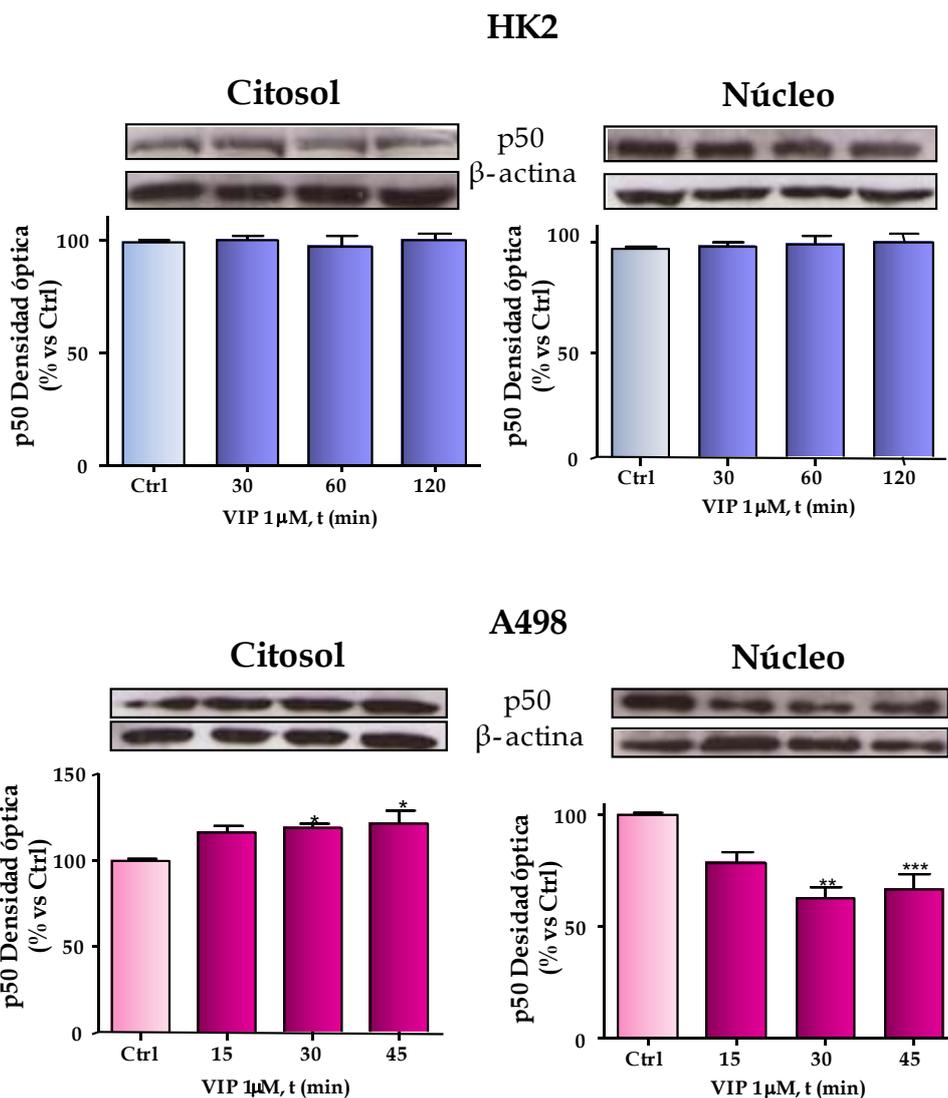
## HK2



## A498



**Figura 37:** Localización de p50 mediante ensayos de inmunocitoquímica, tras diferentes tiempos de tratamiento con 1  $\mu$ M VIP, en ambas líneas celulares. Todas las muestras están realizadas con el marcaje de núcleos con DAPI. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

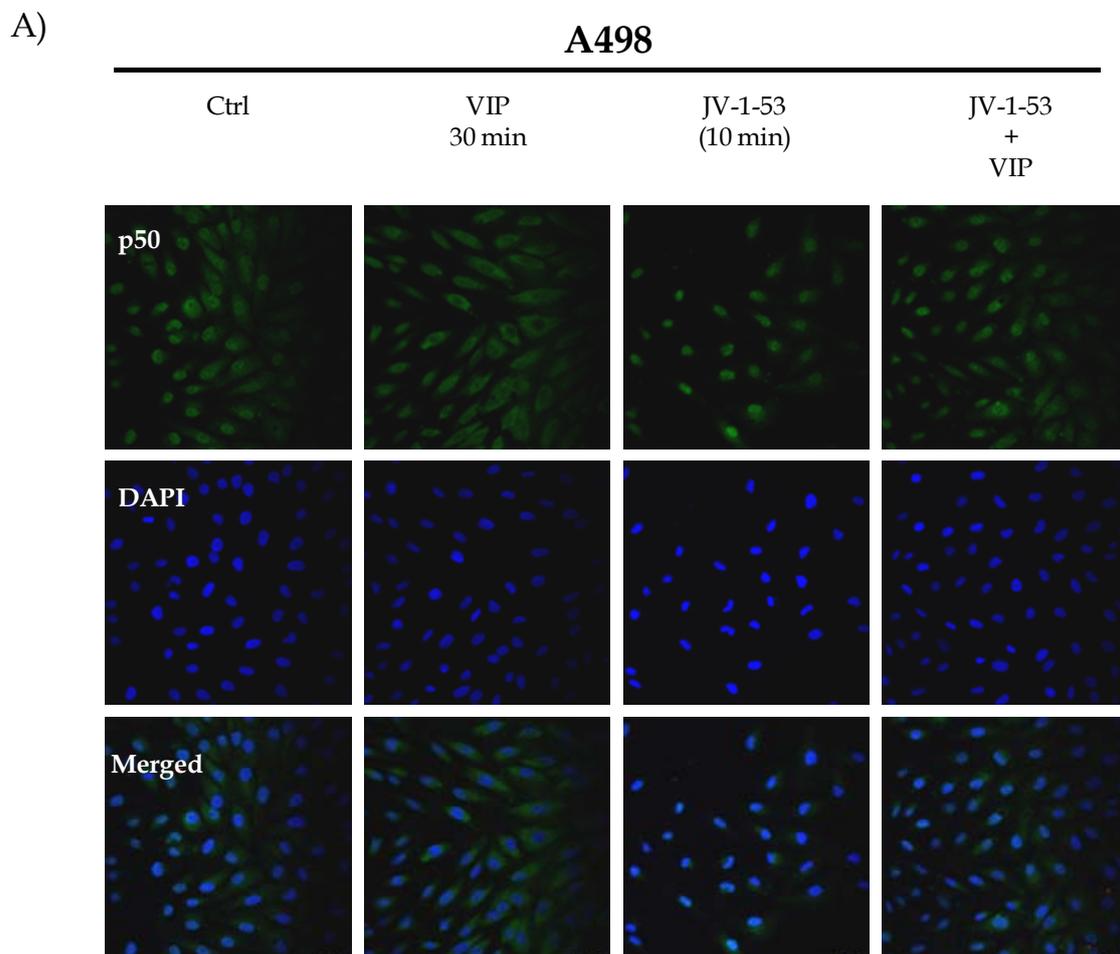


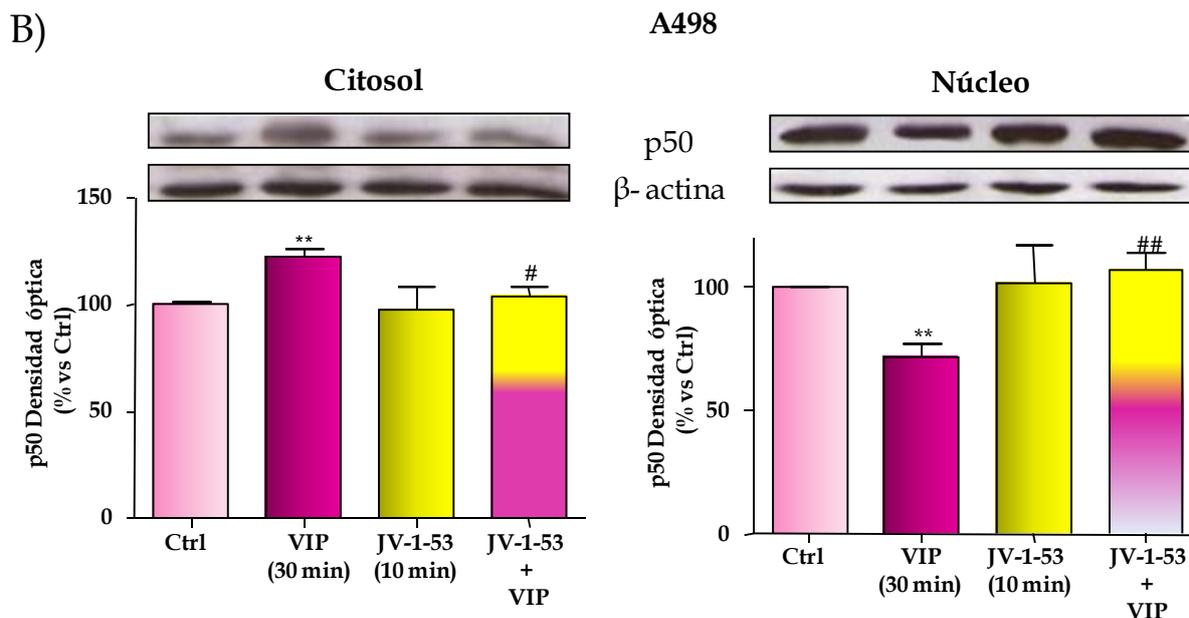
**Figura 38:** Ensayos de inmunodetección de p50 en células HK2 y A498 tratadas con VIP a diferentes tiempos. Los resultados se muestran como el porcentaje de la expresión con respecto a su control. Como control de carga se utiliza β-actina. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media ± E.S.M., \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente a su control.

#### 4.2.1.2. Implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en el efecto de VIP sobre NFκB

Con el fin de conocer el grado de implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en el efecto de VIP sobre la disminución del contenido nuclear de p50 en células A498, nos propusimos utilizar un antagonista sintético para los receptores de VIP. Nuestro grupo de investigación colabora con el laboratorio del Dr. A.V. Schally

(Miami University), donde se sintetiza entre otros muchos péptidos el análogo de GHRH, JV-1-53, antagonista selectivo para los receptores VPAC<sub>1/2</sub>. Para ello, se pretratan las células A498 con 0,3  $\mu$ M JV-1-53 durante 10 min. Posteriormente, se incuban con 1  $\mu$ M VIP durante 30 min, tiempo en el que se había observado el máximo efecto del neuropéptido sobre la translocación nuclear de p50. Se realizan ensayos de inmunocitoquímica (Fig. 39A), así como fraccionamiento celular (Fig. 39B). Como se muestra en las figuras, el efecto de VIP se anula totalmente tras el tratamiento con el antagonista JV-1-53. Estos resultados indican que el efecto de VIP en A498 está mediado a través de los receptores VPAC<sub>1/2</sub>.





**Figura 39:** Efecto del antagonista de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> sobre la expresión y translocación de p50 medido por inmunocitoquímica (A) e inmunodetección (B). Las células A498 se pretratan con JV-1-53 0,3  $\mu$ M y se tratan con VIP 1  $\mu$ M. Las muestras realizadas con inmunofluorescencia presentan el marcaje nuclear DAPI, y como control negativo se realizan preparaciones en ausencia de anticuerpo primario. Para los experimentos de inmunodetección se utiliza  $\beta$ -actina como control de carga. Tanto las imágenes como los blots son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., \*\*  $p < 0,01$  frente al control sin tratar y #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  frente al tratamiento con VIP.

## 4.2.2. Implicación de VIP en la fosforilación de STAT3

### 4.2.2.1. Efecto de VIP en la regulación de STAT3

En segundo lugar, nos planteamos conocer el efecto de VIP sobre la expresión y fosforilación, como medida de su activación, del factor de transcripción STAT3. Las células se incuban con el neuropéptido a diferentes tiempos. En la figura 40 se observa que 1  $\mu$ M VIP no varía la expresión de STAT3 pero, en cambio, provoca una disminución tiempo-dependiente de su fosforilación en la línea celular A498. La menor fosforilación ocurre tras 1-2 h de incubación. En la línea HK2, VIP no produce ninguna modificación significativa ni en la expresión ni en la fosforilación de STAT3.

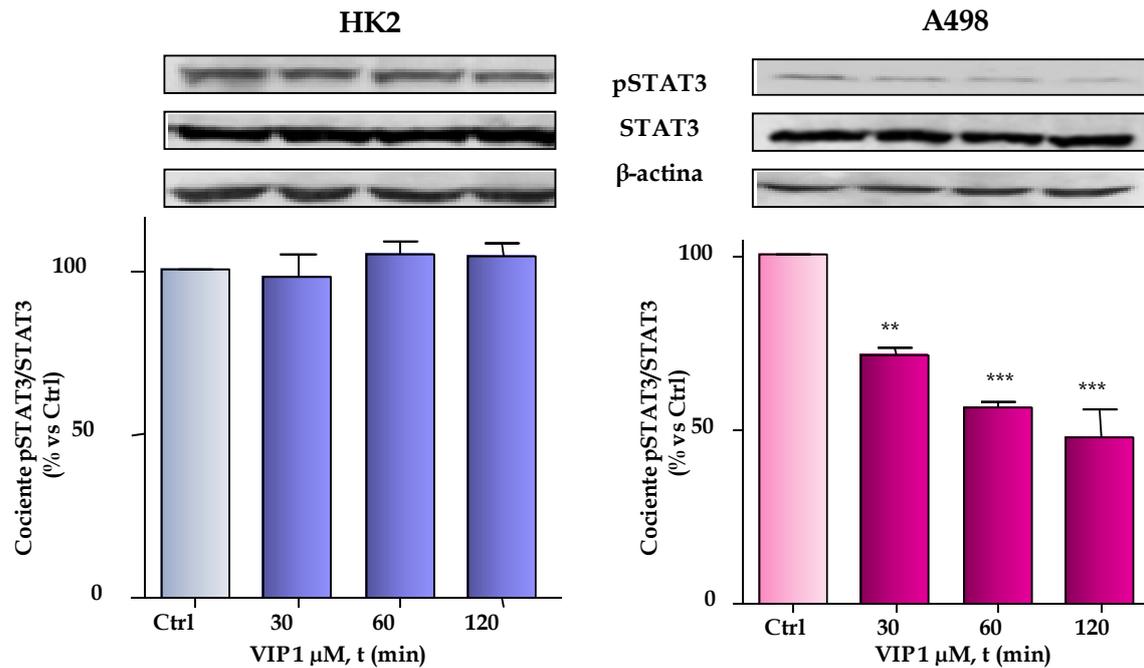
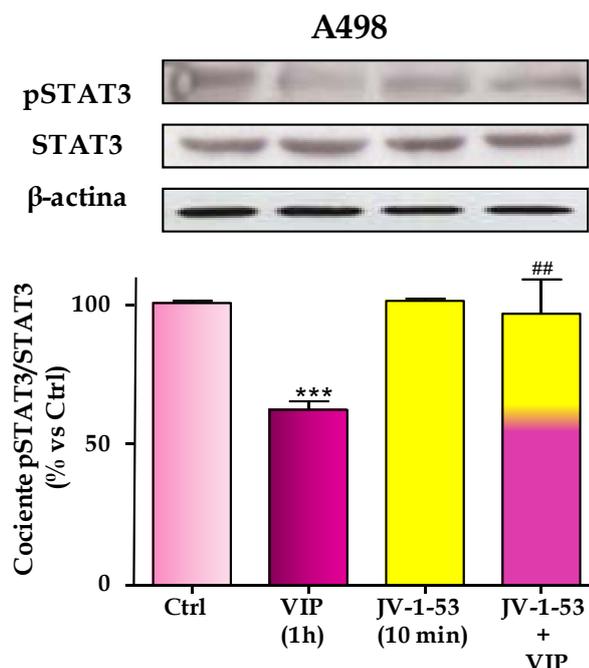


Figura 40: Niveles de expresión y activación de STAT3 medidos por “western blot” en ambas líneas celulares. Los resultados se muestran como el cociente de la fracción fosforilada entre la expresión total. Se utiliza  $\beta$ -actina como control de carga. Todos los resultados son representativos de tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control sin tratar.

#### 4.2.2.2. Implicación de VPAC<sub>1/2</sub> en el efecto de VIP sobre STAT3

Para valorar la implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en el efecto de disminución de la fosforilación de STAT3 producida por VIP, las células A498 se pretratan 10 min con el antagonista JV-1-53 (0,3  $\mu$ M). A continuación, se incuban 1 h con VIP (1  $\mu$ M). Los resultados (Fig. 41) demuestran un bloqueo total del efecto de VIP, tras el tratamiento con JV-1-53, implicando directamente a los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en la disminución de la fosforilación de STAT3 mediada por VIP en células A498.



**Figura 41: Efecto del antagonista de VPAC<sub>1/2</sub> sobre STAT3 en A498.** Las células se incuban con VIP 1  $\mu$ M y/o JV-1-53 0,3  $\mu$ M. Los resultados se muestran como el cociente de la fracción fosforilada entre la expresión total. Se utiliza  $\beta$ -actina como control de carga. Los valores corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., de tres experimentos independientes, \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control sin tratar; y ##  $p < 0,01$  frente al tratamiento con VIP.

### 4.3. IMPLICACIÓN DE VIP EN EL DESARROLLO DE FENOTIPOS DE INICIACIÓN Y PROGRESIÓN TUMORAL

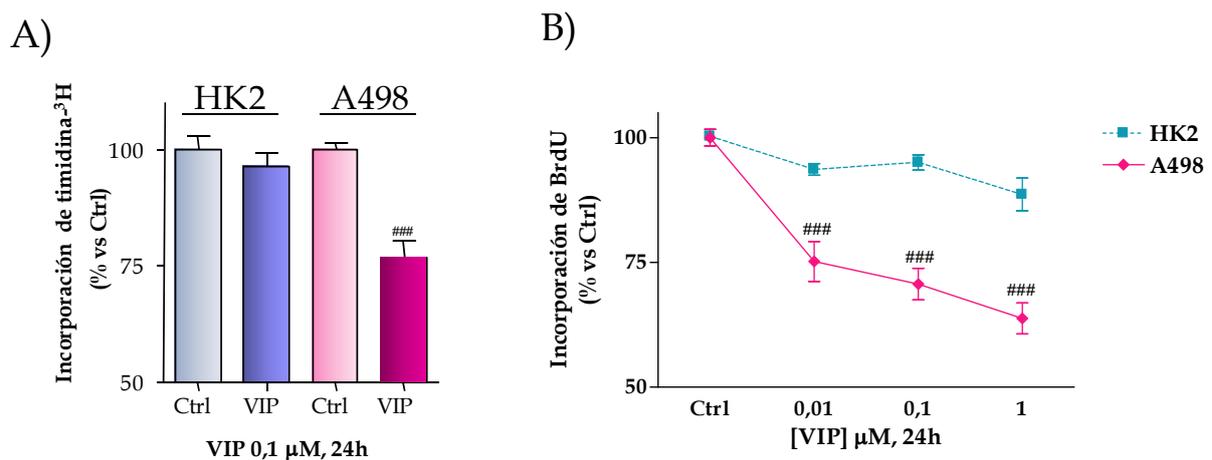
Para conocer si VIP está implicado en procesos de iniciación y progresión del CCR de células claras, se analiza el efecto del neuropéptido sobre procesos de proliferación celular, estrés oxidativo, angiogénesis, degradación de la matriz extracelular, migración e invasión de otros tejidos.

#### 4.3.1. Efecto de VIP en la proliferación celular

La pérdida de regulación de la proliferación celular lleva al desarrollo tumoral. En este apartado se procede a conocer el efecto de VIP sobre la capacidad proliferativa de ambas líneas celulares.

#### 4.3.1.1. Efecto de VIP sobre la proliferación celular

La capacidad proliferativa de las células se mide por dos ensayos: incorporación de timidina tritiada (Fig. 42A) e incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) (Fig. 42B). Para conocer el efecto del VIP sobre la proliferación celular se realizan tratamientos con el neuropéptido durante 24 horas y antes de finalizar se incuban con BrdU durante 1 h o 4 h con timidina tritiada. En ambos casos (Fig. 42) se observa que tras 24 h con 0,1  $\mu\text{M}$  VIP, se produce una disminución de la proliferación celular de aproximadamente el 25%, en la línea celular A498, no habiendo modificaciones en la línea celular HK2. El estudio con bromodesoxiuridina (Fig. 42B) aporta además el detalle de que este efecto es dosis-dependiente. La respuesta es significativa a partir de 0,01  $\mu\text{M}$  de VIP, alcanzándose a 1  $\mu\text{M}$  una disminución de la proliferación del 40%.

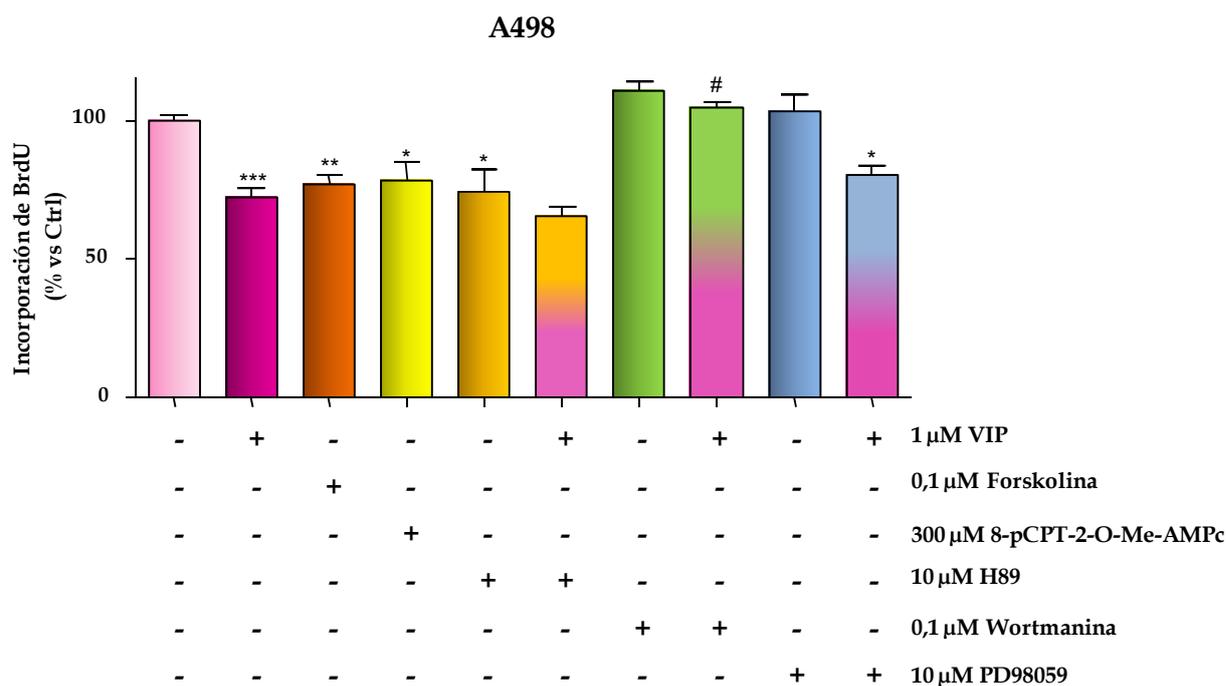


**Figura 42:** Efecto del VIP sobre la proliferación celular medido por la incorporación de timidina tritiada (A) o BrdU (B). Los resultados se expresan en porcentaje frente al control. Los valores, representativos de ocho experimentos independientes, corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., ### $p < 0,001$  frente al control sin tratar.

#### 4.3.1.2. Vías de señalización implicadas en el efecto de VIP sobre la proliferación celular

Nuestro siguiente propósito consistió en conocer las vías de señalización a través de las cuales VIP reduce la capacidad proliferativa en células A498. Para ello,

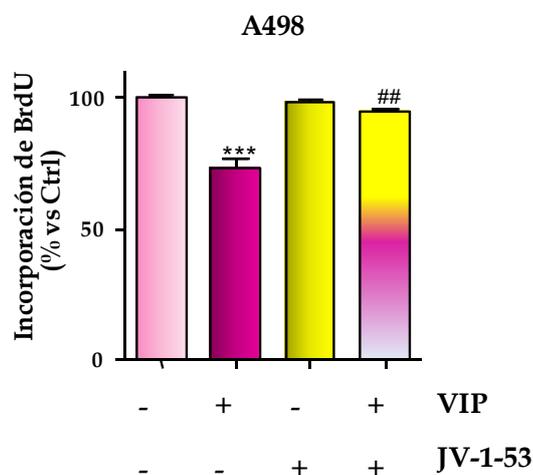
se realizan ensayos de incorporación de BrdU con forskolina, un agonista sintético de EPAC y diferentes inhibidores de proteínas quinasas. Los resultados mostrados en la figura 43 indican, en primer lugar, que la forskolina y el análogo de EPAC (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) ejercen el mismo efecto que VIP al obtener con ambos una respuesta similar de disminución de la proliferación celular. La implicación de las proteína quinasas PKA, PI3K y MEK1/2 se mide a través del efecto que tienen los inhibidores H89, wortmanina y PD98059, respectivamente. El resultado muestra que el único inhibidor que revierte la disminución de proliferación con el neuropéptido es wortmanina, implicando a la vía PI3K en este efecto. Además, H89 provoca una disminución significativa de la proliferación, en ausencia de VIP, indicando la participación de PKA en la estimulación de la capacidad proliferativa basal de A498.



**Figura 43: Efecto de diferentes agonistas e inhibidores de proteína quinasas sobre la proliferación en células A498.** Los pretratamientos con los inhibidores se realizan a diferentes tiempos: H89 (15 min), wortmanina (30 min) y PD98059 (1h). Posteriormente, las células fueron incubadas 24 h con VIP, forskolina ó 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP; 1 h antes de finalizar el tratamiento, se incuban con 1  $\mu$ M BrdU. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los valores se expresan en porcentaje frente al control y corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control sin tratar; y ###  $p < 0,001$  frente a las células tratadas con VIP.

#### 4.3.1.3. Implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en el efecto de VIP sobre la proliferación

Una vez valoradas las vías de señalización de VIP nos propusimos conocer si en esta disminución de la proliferación están implicados los receptores VPAC<sub>1/2</sub>. Para ello, se realizan ensayos de incorporación de BrdU en células A498 pretratadas durante 10 min con JV-1-53 e incubadas 24 h con VIP. En la figura 44 se muestra el efecto del antagonista de GHRH, que bloquea totalmente el efecto inhibitorio de VIP, relacionando directamente a los receptores VPAC<sub>1/2</sub>.

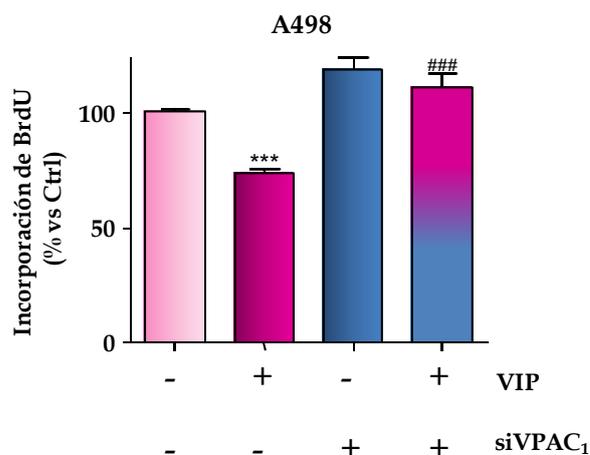


**Figura 44:** Efecto del análogo de GHRH, JV-1-53, sobre la disminución de la proliferación en células A498 mediada por VIP. Se realiza un pretratamiento con JV-1-53 0,3  $\mu$ M (10 min); después, las células se incuban 24 h con VIP 0,1  $\mu$ M, y 1 h antes de finalizar el tratamiento, se tratan con BrdU 1  $\mu$ M. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los datos se expresan en porcentaje frente al control y corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control; y \*\*  $p < 0,01$  frente al tratamiento con VIP.

#### 4.3.1.4. Efecto del silenciamiento de VPAC<sub>1</sub> sobre la proliferación celular

Una vez valorado el efecto de JV-1-53 sobre la proliferación de las células tumorales, nos planteamos profundizar un poco más y analizar el efecto del silenciamiento del principal receptor para VIP, VPAC<sub>1</sub>. Para ello, como se indica en el apartado 3.2.9. de Materiales y Métodos, se determinan previamente las condiciones para conseguir el silenciamiento adecuado de VPAC<sub>1</sub>. En primer lugar se silencian las

células A498, después se tratan con VIP (0,1  $\mu$ M) durante 24h, y finalmente se mide la incorporación de BrdU. Como se muestra en la figura 45, el silenciamiento del receptor produce un incremento significativo del 28% de la proliferación de las células tumorales. Si estas células se incuban con VIP, muestran un aumento significativo de la proliferación frente a las células que expresan VPAC<sub>1</sub>, bloqueando completamente el efecto del neuropéptido. Este resultado implica directamente al receptor VPAC<sub>1</sub> en el efecto de VIP sobre la disminución de la proliferación en las células A498.

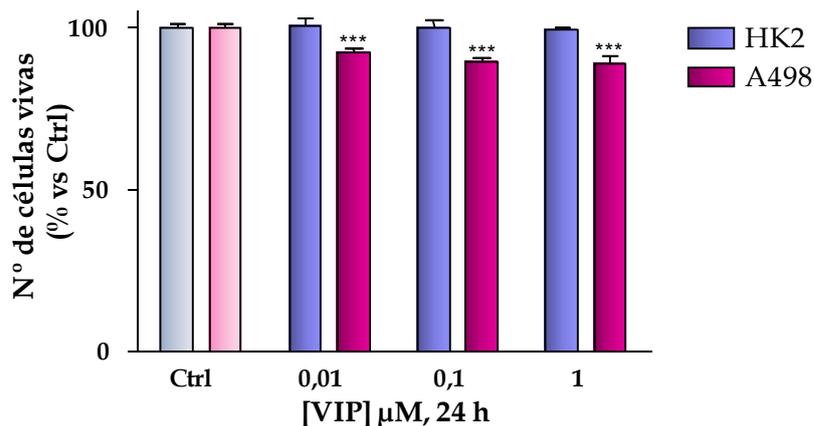


**Figura 45: Efecto del silenciamiento del receptor VPAC<sub>1</sub>, sobre la disminución de la proliferación en A498.** Las células fueron incubadas 24h con VIP 0,1  $\mu$ M. El tratamiento con el neuropéptido se realiza antes de finalizar el tiempo de silenciamiento del receptor (72h). Los resultados se expresan en porcentaje frente al control (tratadas con la secuencia "scramble"). Los valores son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control; ###  $p < 0,001$  frente a VIP.

#### 4.3.1.5. Efecto de VIP en la viabilidad celular

Para conocer si la disminución de la proliferación se genera por citotoxicidad celular, se valora el efecto de VIP en ambas líneas celulares, mediante el estudio de la capacidad celular para reducir la sal de tetrazolio, MTT. Se trata de una técnica que sirve como indicador de la integridad mitocondrial y por tanto, su actividad funcional puede ser interpretada como una medida de la viabilidad celular. Para ello, se incuban las dos líneas celulares con concentraciones crecientes de VIP. Como se muestra en la figura 46, en la línea celular HK2 no hay modificación de la

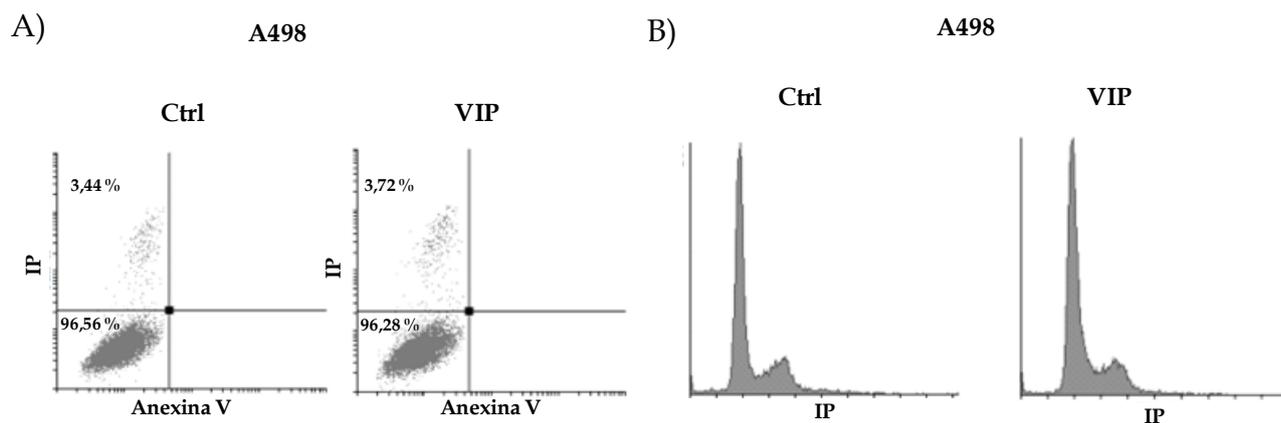
viabilidad mitocondrial a ninguna concentración, indicando que VIP no produce citotoxicidad en esta línea celular. En cambio, para A498 se observa una disminución significativa de la viabilidad mitocondrial en las concentraciones observadas, pero solo un 10%, lo que no corresponde con la disminución de la proliferación que ejerce VIP.



**Figura 46:** Efecto de concentraciones crecientes de VIP sobre la viabilidad mitocondrial, en ambas líneas celulares, medido por ensayos de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de células vivas frente al control sin tratar. Los datos son representativos de seis experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., \*\*\*  $p < 0,001$  frente a su control.

#### 4.3.1.6. Efecto de VIP sobre el ciclo celular

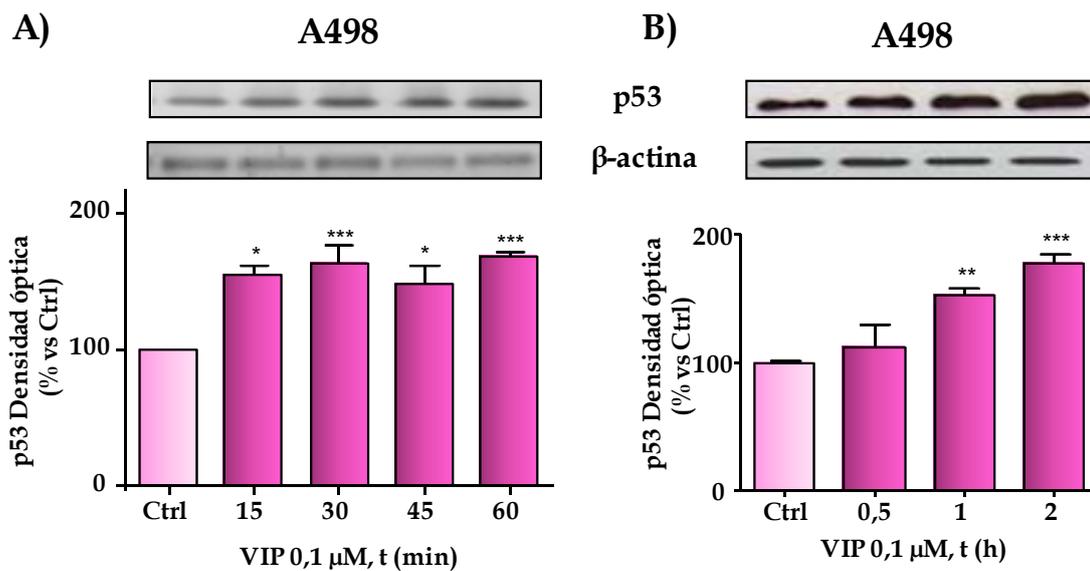
Para conocer la causa de la disminución del número de células nos propusimos valorar si VIP provoca muerte celular en la línea celular A498. Así, mediante ensayos de citometría de flujo con Ioduro de propidio (IP) y Anexina V, se valora el efecto de  $0,1 \mu\text{M}$  VIP durante 24 h sobre la apoptosis temprana/tardía o la necrosis. Como se observa en la figura 47A, VIP no produce muerte celular por apoptosis ni necrosis. De este modo, nos planteamos valorar su efecto sobre el ciclo para determinar la causa de la disminución de la proliferación. Como se puede observar en la figura 47B, los ensayos de ciclo celular con IP muestran que 24 h de incubación con VIP tampoco produce parada de ciclo.



**Figura 47:** Efecto de VIP sobre la muerte celular mediante ensayos de incorporación de Anexina V/IP (A) o IP (B), tras 24h de incubación con VIP. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

#### 4.3.1.7. Efecto de VIP sobre la expresión de p53

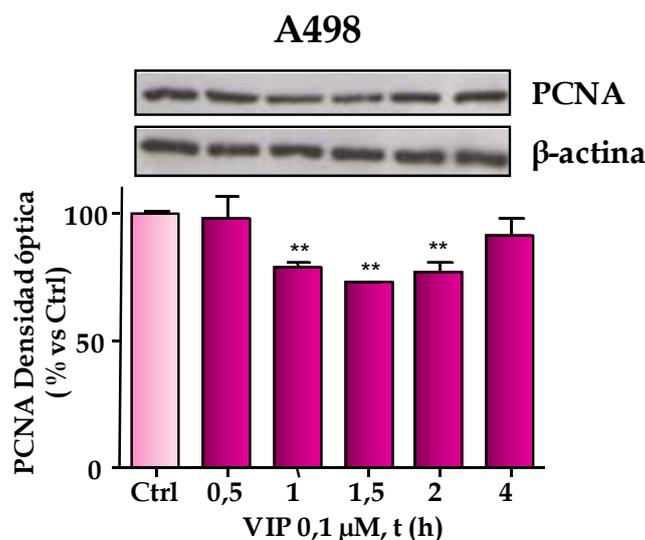
A pesar de no encontrar por citometría de flujo ninguna señal indicadora de parada de ciclo celular, nos propusimos valorar los niveles de expresión de p53. Las células tratadas con 0,1  $\mu$ M VIP a diferentes tiempos, analizadas por RT-PCR semicuantitativa e inmunodetección, se alteran por el tratamiento con el neuropéptido. Como control de carga se utiliza  $\beta$ -actina. Los resultados representados en la figura 48A muestran que VIP, desde los 15 min de incubación, incrementa significativamente los niveles de expresión del ARNm de p53 en células A498, hasta llegar a un 50%, manteniendo este efecto en todos los tiempos estudiados. Además el análisis de expresión de p53 por inmunodetección revela que el tratamiento con VIP produce un incremento significativo de los niveles de p53 en células tumorales (Fig. 48B). Este aumento de p53 podría explicar la disminución de la proliferación observada.



**Figura 48:** Expresión p53 en células A498 medido por RT-PCR (A) e inmunodetección (B). El resultado se normaliza con  $\beta$ -actina. Se muestran los valores de la media de tres experimentos  $\pm$  E.S.M., \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente a las células sin tratar.

#### 4.3.1.8. Efecto de VIP sobre la expresión de PCNA

Tras analizar el efecto del neuropéptido sobre la expresión de p53, consideramos valorar si además era capaz de modificar la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). Esta proteína sintetizada en las fases G1 y S del ciclo celular participa en la síntesis de ADN y es necesaria para completar el proceso de proliferación celular. En la figura 49 se muestra que, en las células A498, VIP disminuye los niveles de expresión de PCNA de manera tiempo dependiente, siendo el efecto más significativo entre 1 y 2 horas de incubación con el neuropéptido. A las 4 h se recuperan los niveles control. Este resultado concuerda con el incremento de p53 y la disminución de la proliferación que ejerce VIP en células A498.



**Figura 49:** Niveles de expresión de PCNA medidos por “western blot” tras los tratamientos con VIP a distintos tiempos, en células A498. Los resultados se expresan en porcentaje frente al control y los valores son la media de tres experimentos independientes  $\pm$  E.S.M., \*\*  $p < 0,01$  frente a las células sin tratar.

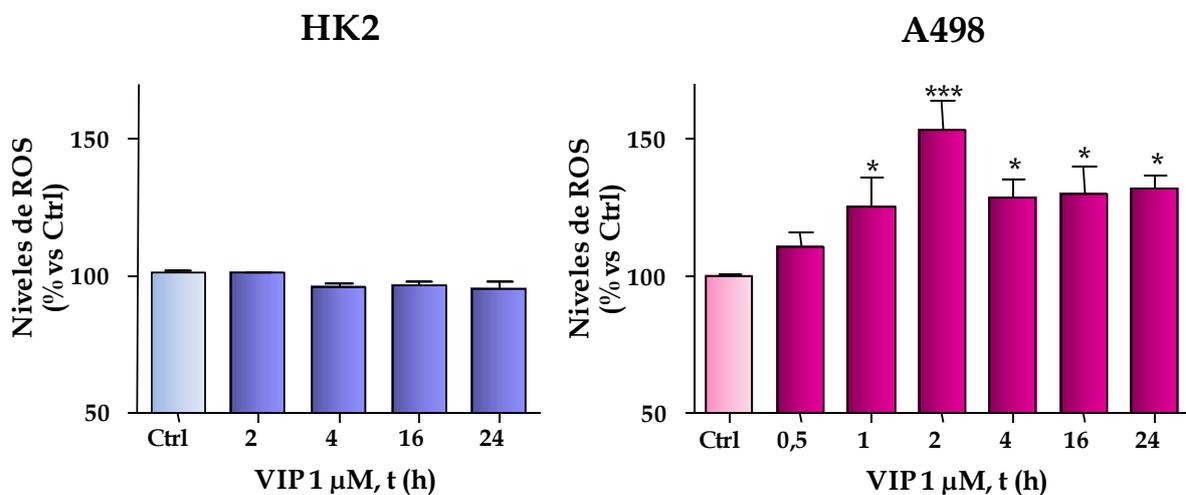
#### 4.3.2. Efecto de VIP sobre la producción de radicales libres

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante en los tratamientos de quimioterapia, dado que aumentan sus niveles y producen toxicidad en las células tumorales. Por esta razón, nos propusimos valorar el efecto de VIP sobre los niveles de ROS en ambas líneas celulares.

##### 4.3.2.1. Efecto de VIP sobre los niveles de ROS

El efecto de VIP sobre los niveles de ROS en células HK2 y A498 se mide por ensayos de incorporación de la sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA mediante la emisión de fluorescencia. Ambas líneas celulares fueron tratadas con 1  $\mu$ M VIP a diferentes tiempos y posteriormente incubadas 1 h con la sonda. La figura 50 muestra que el tratamiento con el neuropéptido produce un incremento significativo en los niveles de ROS en células A498, observándose un pico a las 2 h. En cambio, en células HK2 estos niveles no se modificaron después del tratamiento con VIP. De estos

resultados se deduce que VIP genera un incremento de ROS que puede ser citotóxico para las células tumorales.

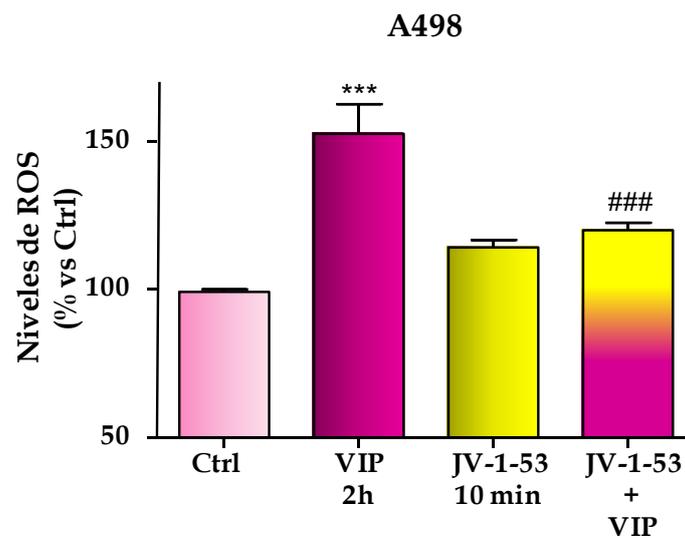


**Figura 50:** Niveles de ROS medidos por sonda de fluorescencia, en células HK2 y A498 tratadas con VIP a diferentes tiempos. Los resultados son la media de fluorescencia por célula y se muestran como el porcentaje de fluorescencia con respecto al control sin tratar. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes,  $\pm$  E.S.M., \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control no tratado.

#### 4.3.2.1.1. Vías de señalización implicadas en el efecto de VIP sobre ROS

En este apartado se valora la implicación del segundo mensajero AMPc, además de la participación de diferentes agonistas de EPAC e inhibidores de proteína quinasas en la producción de ROS. Las células A498 fueron incubadas durante 2 h con el estimulador directo de la adenilato ciclasa, forskolina, y con el agonista de EPAC, 8-pCPT-2'-o-Me-cAMP. La figura 51 muestra que ambas moléculas producen un incremento muy significativo, similar al de VIP, en los niveles de ROS. Además, los tratamientos con los inhibidores de proteína quinasas reflejan dos vías de señalización para VIP. Tanto wortmanina como PD98059 revierten totalmente el efecto de VIP sobre los niveles de ROS (Fig. 51), implicando a PI3K y a MEK1/2 como mediadores del incremento de radicales.





**Figura 52:** Efecto de JV-1-53 sobre el incremento de los niveles de ROS producido por VIP en células A498 medidos por sonda de fluorescencia. Los resultados son la media de fluorescencia por célula y se muestran como el porcentaje de fluorescencia con respecto al control sin tratar. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., \*\*\*  $p < 0,001$ ; frente al control no tratado y #  $p < 0,05$  frente a las células tratadas con VIP.

### 4.3.3. Efecto de VIP sobre la expresión de VEGF<sub>165</sub>

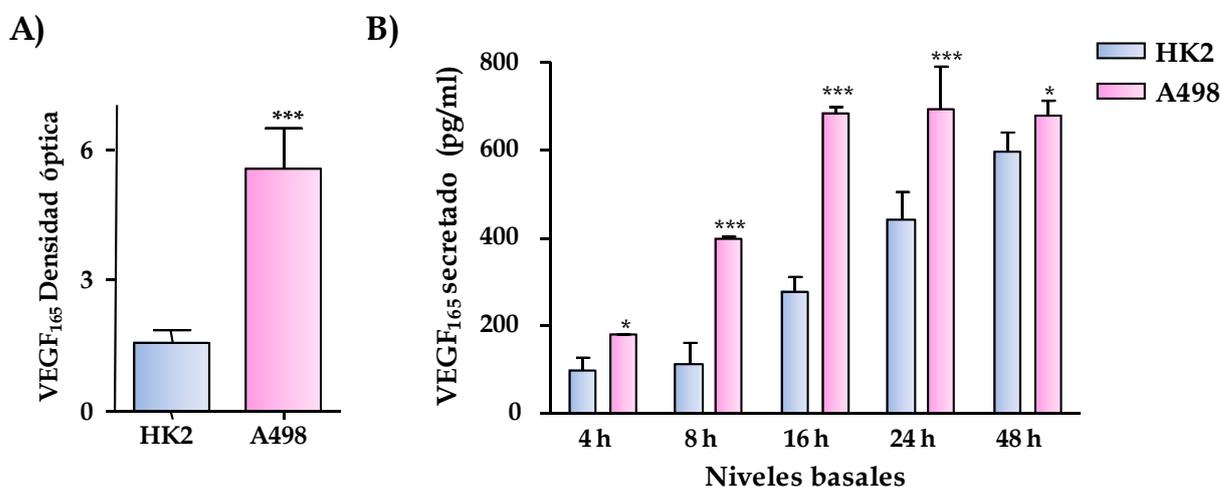
En este apartado se valora la posible implicación de VIP en la capacidad angiogénica de ambas líneas celulares. Para ello, se analizan los niveles de expresión de uno de los principales factores proangiogénicos, VEGF.

#### 4.3.3.1. Expresión de VEGF secretado en células del epitelio tubular proximal

La línea celular A498 carece de la proteína VHL (encargada de la degradación proteosomal del factor HIF en condiciones no hipóxicas). Uno de los genes regulados a través de la activación de HIF, es VEGF, por lo que nos planteamos valorar los niveles basales del factor pro-angiogénico VEGF en ambas líneas celulares.

Como se muestra en la figura 53, la línea celular A498 cuadriplica los niveles basales de expresión del mensajero VEGF con respecto a HK2. Lo mismo ocurre con

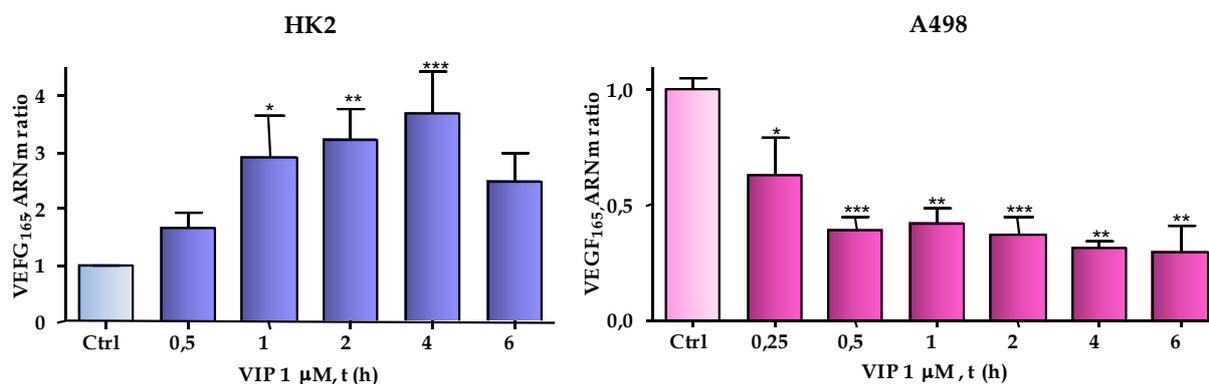
la secreción extracelular de este factor angiogénico. A partir de 8 h, las células A498 secretan cuatro veces más VEGF que las células HK2.



**Figura 53:** Comparativa de los niveles de expresión por RT-PCRq (A) y de secreción mediante ELISA (B) de VEGF<sub>165</sub> en células HK2 y A498. Se muestran los niveles de secreción de cada línea celular en diferentes tiempos. Los valores son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  E.S.M., \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  frente a las células HK2.

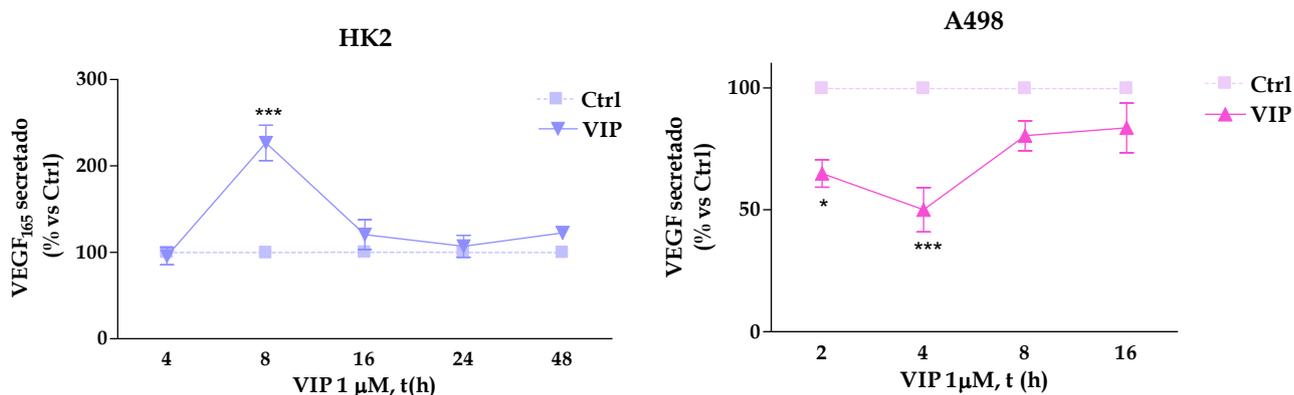
#### 4.3.3.2. Efecto de VIP en la secreción de VEGF<sub>165</sub>

Una vez analizada la expresión basal de VEGF en ambas líneas celulares, nos propusimos valorar si VIP ejercía algún efecto sobre su expresión y secreción. Para ello, se valoran los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa (Fig. 54) además de los niveles del péptido en el medio extracelular (Fig. 55) en células HK2 y A498 tratadas con 1  $\mu$ M VIP a diferentes tiempos. Como se muestra en la figura 54, en las células HK2 el tratamiento con VIP produce un incremento de la producción del ARNm. Por el contrario, en las células A498 los elevados niveles de expresión del VEGF disminuyen tras el tratamiento con el neuropéptido.



**Figura 54:** Efecto de VIP sobre la expresión de VEGF<sub>165</sub> medido por RT-PCRq en células HK2 y A498. Las células se tratan con 1 μM VIP a diferentes tiempos. Los valores, representativos de tres experimentos independientes, corresponden a la media ± E.S.M., \* p< 0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001 frente al control sin tratar.

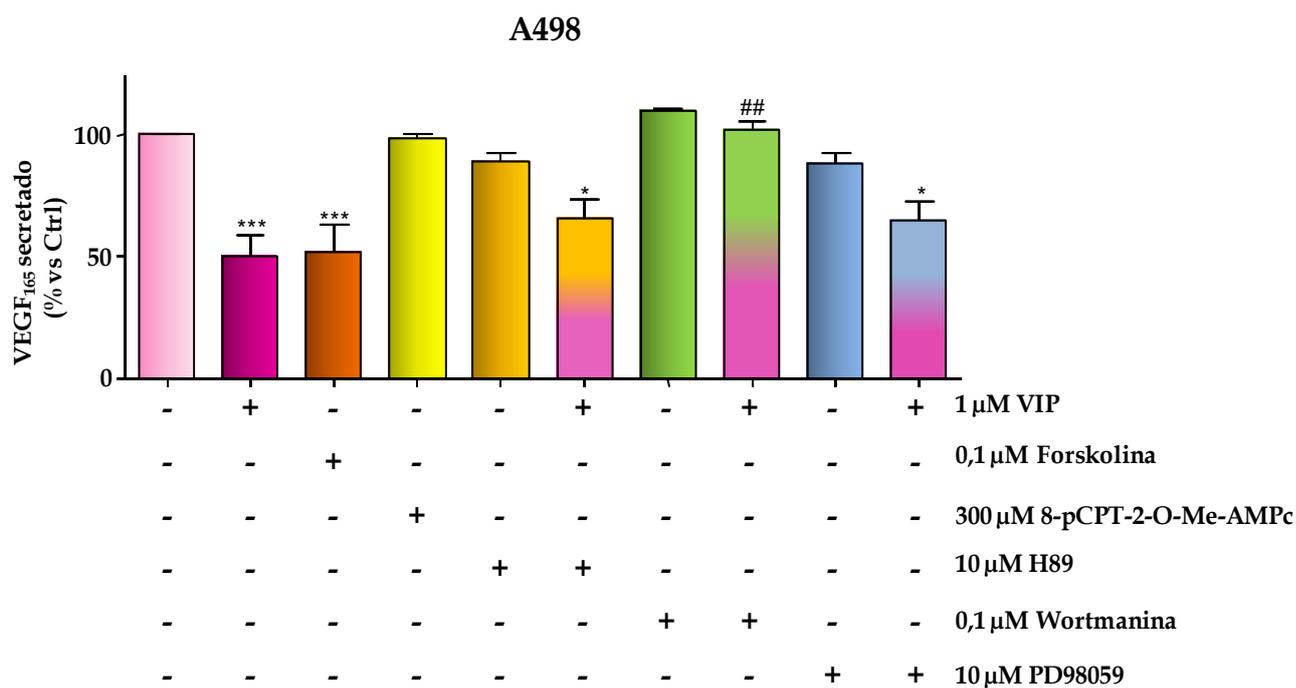
Se valoran por ELISA los niveles de VEGF secretado con ambas líneas celulares. Los resultados que se muestran en la figura 55 confirman los obtenidos por RT-PCRq: VIP ejerce efectos contrarios en ambas células. Mientras que en células HK2 el tratamiento con VIP incrementa la secreción de VEGF en tan solo 8 h, en células A498 produce una disminución significativa de aproximadamente un 50% en tan solo 4 h.



**Figura 55:** Efecto de VIP en la secreción de VEGF<sub>165</sub> en células HK2 y A498, valorado mediante ELISA. Las células se tratan con 1 μM VIP a diferentes tiempos. Los valores, representativos de tres experimentos independientes, corresponden a la media ± E.S.M., \* p< 0,05; \*\*\* p< 0,001 frente al control sin tratar.

#### 4.3.3.3. Vías de señalización implicadas en el efecto de VIP sobre la secreción de VEGF<sub>165</sub>

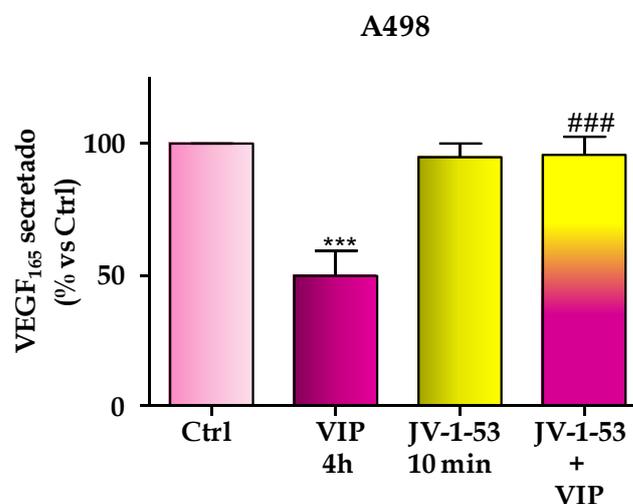
Una vez descrito el efecto que VIP ejerce sobre la expresión de VEGF, nos dispusimos a valorar las vías de señalización implicadas en la disminución de su expresión. Mediante ELISA, se valoran los niveles de secreción en las células A498 tratadas con los distintos agonistas e inhibidores de proteínas quinasas y/o VIP durante 4 h. Los resultados que se muestran en la figura 56 demuestran que forskolina ejerce la misma disminución de los niveles de VEGF que realiza el neuropéptido. Además, los pretratamientos con los diferentes inhibidores de proteínas quinasas y la posterior incubación con VIP, revelan que el bloqueo de la vía PI3K que ejerce la wortmanina es capaz de bloquear el efecto del neuropéptido sobre la secreción de VEGF.



**Figura 56:** Efecto de diferentes agonistas e inhibidores de proteína quinasas sobre la acción de VIP en la secreción de VEGF<sub>165</sub> en células A498, valorado mediante ELISA. Las células se pretratan con los inhibidores a diferentes tiempos: H89 (15 min), wortmanina (30 min) y PD98059 (1 h). Posteriormente, se incuban 4 h con VIP, forskolina y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes, cuyos valores corresponden a la media ± E.S.M., \*\*\* p < 0,001 frente al control y ## p < 0,01 frente a las células tratadas con VIP.

#### 4.3.3.4. Implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en el efecto de VIP sobre la secreción de VEGF<sub>165</sub>

Para conocer si los receptores de VIP están implicados en la disminución de la secreción de VEGF en células A498, se pretratan 10 min con JV-1-53 y posteriormente se incuban durante 4 h con el neuropéptido. En la figura 57 se observa que JV-1-53 bloquea completamente la disminución de la secreción de VEGF que ejerce VIP sobre las células A498, implicando directamente a los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en este efecto.



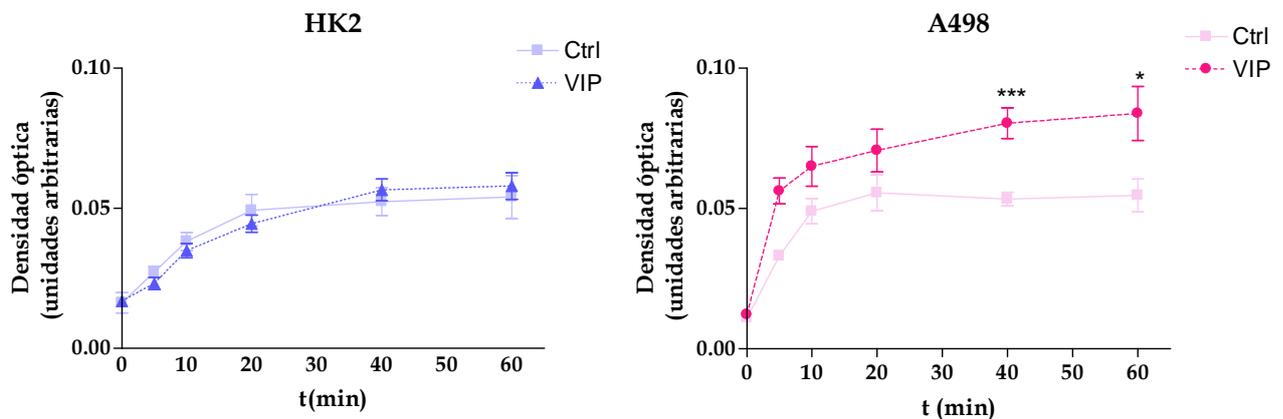
**Figura 57:** Efecto de JV-1-53 sobre la disminución de VEGF producida por VIP en células A498 medidos por ELISA. Los resultados son la media de fluorescencia por célula y se muestran como el porcentaje de fluorescencia con respecto al control sin tratar. Los valores, representativos de tres experimentos independientes, corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control no tratado y ###  $p < 0,001$  frente a las células tratadas con VIP.

#### 4.3.4. Efecto de VIP sobre la adhesión celular

Durante el desarrollo de metástasis, una célula tumoral pierde la capacidad de adherencia consiguiendo más autonomía para poder migrar. Por ello, nos planteamos analizar si VIP está implicado en la adhesión de ambas líneas celulares a una matriz de colágeno.

#### 4.3.4.1. Efecto de VIP sobre la adhesión celular

Para estudiar si VIP es capaz de modificar la capacidad de las células renales para adherirse a la matriz extracelular, se realizan ensayos con colágeno que proporciona una matriz similar a la matriz extracelular. La capacidad celular para migrar es inversamente proporcional al grado de adhesión a esta matriz. En la figura 58 se muestra el efecto de VIP a diferentes tiempos sobre la adherencia al colágeno de las dos líneas celulares. En células HK2, el tratamiento con VIP no modificó los niveles de adhesión. En cambio, en células A498 se observa que el neuropéptido incrementa la capacidad adhesiva de las células al colágeno, de manera tiempo dependiente. Tras 40 min de incubación con VIP se observan resultados significativos, obteniéndose un aumento de la adhesión de las células tumorales del 25%.

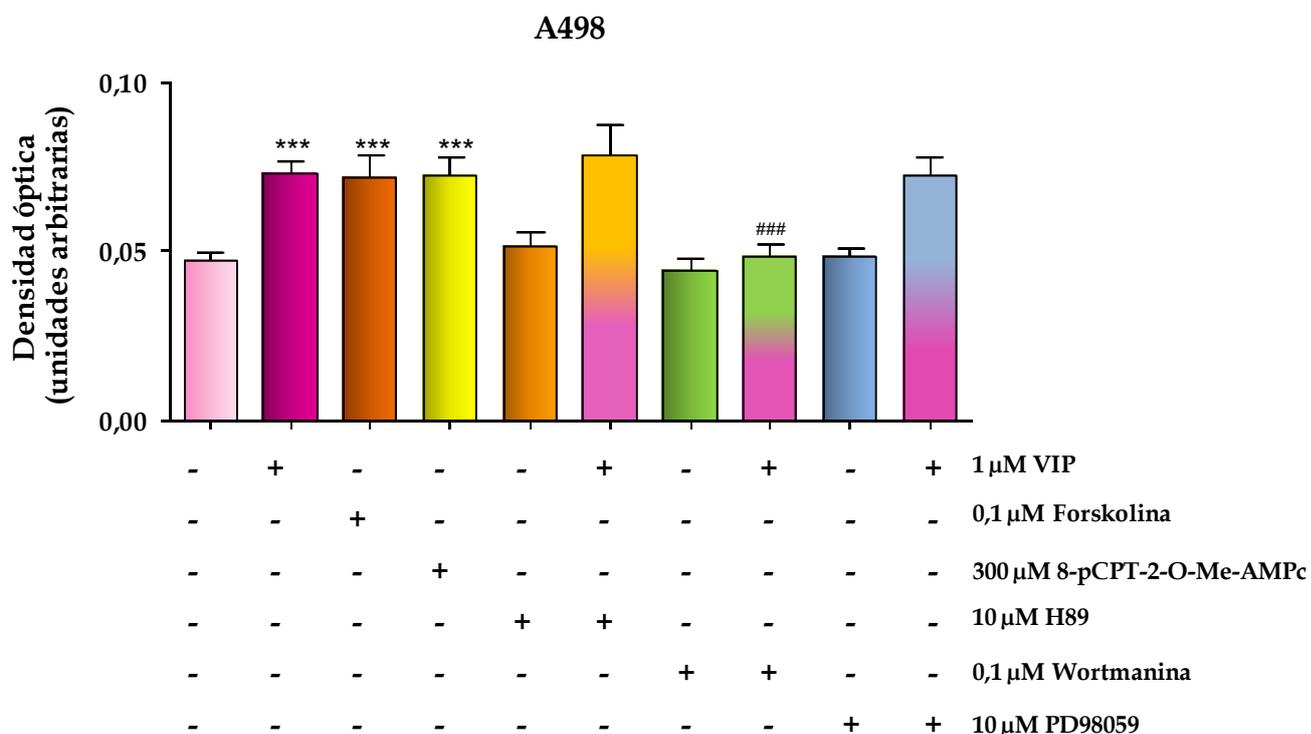


**Figura 58:** Efecto de VIP sobre la adhesión celular en ambas líneas celulares a diferentes tiempos.

Se realiza un tratamiento con VIP 1  $\mu$ M a diferentes tiempos sobre una placa pretratada con colágeno tipo I. La valoración de la adhesión celular se realiza por ensayos colorimétricos ( $\lambda=570/630$  nm) Los valores, representativos de tres experimentos independientes, corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control sin tratar.

#### 4.3.4.2. Vías de señalización implicadas en el efecto de VIP sobre la adhesión celular

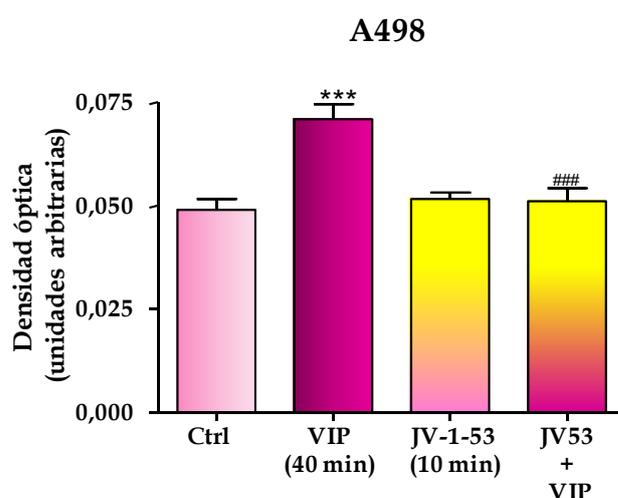
En primer término se valora la implicación del segundo mensajero AMPc, así como la participación del agonista de EPAC e inhibidores de proteína quinasas. En la figura 59 se observa que los tratamientos con forskolina y el análogo de EPAC, provocan un incremento en la capacidad de adhesión de las células tumorales, el mismo efecto que VIP. Los tratamientos con los inhibidores de proteína quinasas indican un único bloqueo del efecto de VIP cuando las células se incuban con wortmanina. Así, PI3K parece estar implicado en el incremento de la adhesión de las células tumorales provocado por VIP.



**Figura 59:** Efecto de diferentes agonistas e inhibidores de proteínas quinasas sobre la disminución en la adhesión celular en células A498, ejercida por VIP. Se realiza un pretratamiento con los inhibidores a diferentes tiempos: H89 (15 min), wortmanina (30 min) y PD98059 (1h). Posteriormente, las células se incuban 24h con VIP, forskolina ó 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre una placa pretratada con colágeno tipo 1. La valoración de la adhesión celular se realiza por ensayos colorimétricos ( $\lambda=570/630$  nm). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control sin tratar y ###  $p < 0,001$  frente a las células tratadas con VIP.

#### 4.3.4.3. Implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en el efecto de VIP sobre la adhesión en células A498

Se valora la implicación de VPAC<sub>1/2</sub> en los efectos de VIP sobre la adhesión celular. Las células A498 se pretratan con JV-1-53, durante 10 min, y posteriormente 40 min con el neuropéptido. El resultado muestra que el bloqueo de los receptores revierte el efecto de VIP sobre la adhesión, recuperándose el nivel de adhesión basal (Fig. 60).

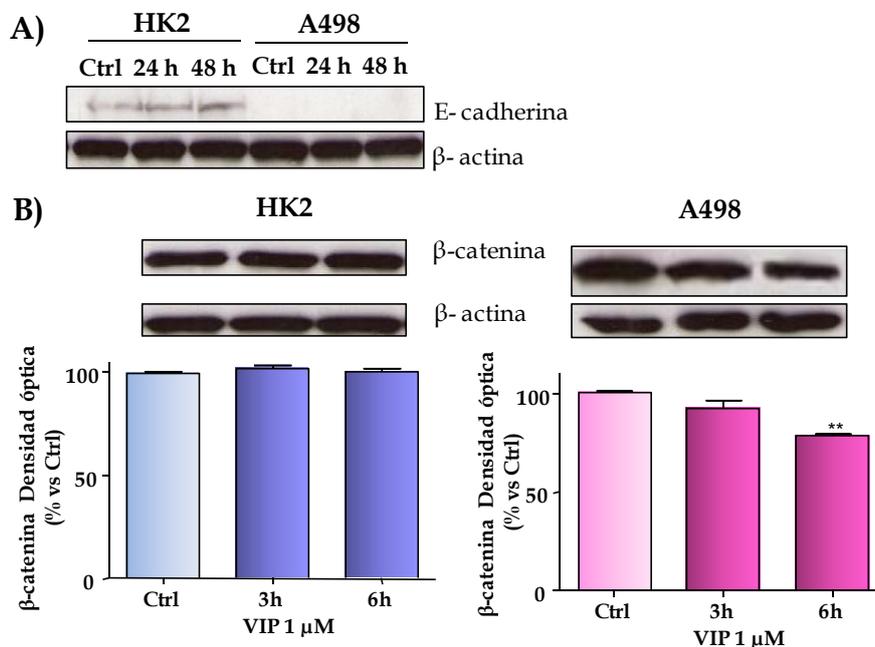


**Figura 60:** Efecto de JV-1-53 en la acción de VIP sobre la adhesión en células A498. Se realiza un pretratamiento con JV-1-53 0,3  $\mu$ M (10 min); después, las células se incuban 40 min con 1  $\mu$ M VIP sobre una placa pretratada con colágeno tipo I. Los resultados, representativos de tres experimentos independientes, corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control y ###  $p < 0,001$  frente a VIP.

#### 4.3.4.4. Efecto de VIP sobre la expresión de proteínas implicadas en adhesión

Las células tumorales con gran capacidad metastásica presentan bajos niveles de la proteína E-cadherina pero tienen incrementada la expresión de  $\beta$ -catenina en el núcleo. En este apartado nos propusimos valorar si VIP podía modificar ambos niveles. Como se observa en la figura 61A, VIP no altera los niveles de expresión de E-cadherina en células HK2. En células A498 no se detectan niveles de expresión de E-cadherina, tal y como está descrito en la literatura (Lineham y col., 2010), siendo el neuropéptido incapaz de revertir la falta de expresión de la proteína. En cambio,

los niveles de  $\beta$ -catenina nucleares, elevados en ambas células, sí se ven significativamente disminuidos en células A498, tras el tratamiento con VIP e inalterados cuando se trata de la línea celular HK2 (Fig. 61B).



**Figura 61:** Niveles de expresión de E-cadherina (A) y  $\beta$ -catenina nuclear (B) medidos por “western blot” en ambas líneas celulares tratadas con 1  $\mu$ M VIP a diferentes tiempos. Los resultados se expresan en porcentaje frente al control; son representativos de tres experimentos independientes que corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*  $p < 0,01$  frente a su control sin tratar.

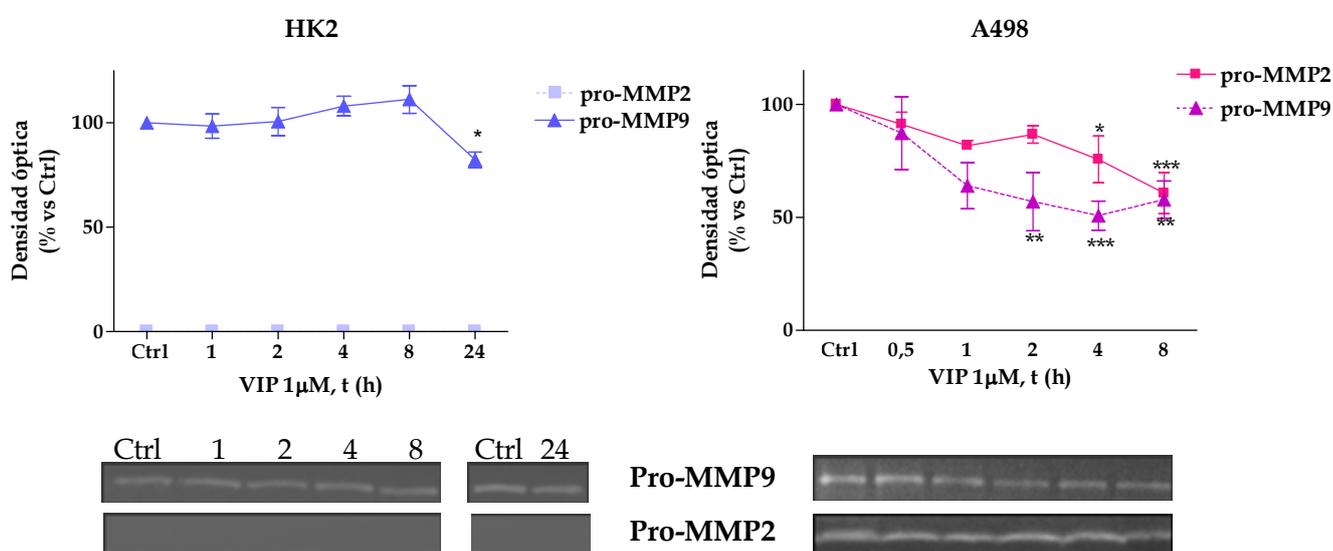
#### 4.3.5. Efecto de VIP en procesos degradativos de la matriz extracelular

Para conocer el efecto de VIP sobre la capacidad de degradación de la matriz extracelular, se procede al análisis de la actividad de las metaloproteasas 2 y 9 (MMP2 y MMP9).

##### 4.3.5.1. Efecto de VIP sobre la expresión de metaloproteasas

En este apartado, se procede a valorar el efecto de VIP sobre la actividad gelatinolítica en células HK2 y A498. Ambas líneas celulares fueron tratadas con VIP a diferentes tiempos y, como se muestra en la figura 62, se observa que el neuropéptido no ejerce ningún efecto significativo sobre las células HK2, en

tiempos cortos, aunque tras 24 h de tratamiento hay una ligera disminución de la actividad pro-MMP9. Para la pro-MMP2, no se ha observado expresión en esta línea celular. Las células A498 muestran una elevada actividad degradativa para las dos prometaloproteasas analizadas. Para la pro-MMP9, en la figura 62 se puede observar que, tras 4 h de tratamiento con VIP, se produce una disminución del 50% en la actividad de la pro-MMP-9, y este efecto se mantiene al menos 8 h. Para la pro-MMP2, se observa que tras 4 h con VIP disminuye la actividad degradativa alrededor de un 20 %, y este efecto se mantiene al menos hasta las 8 h (Fig. 62).



**Figura 62:** Efecto de VIP sobre la actividad gelatinolítica medida por zimografía en células HK2 y A498. Las células se incuban en medio condicionado en ausencia o presencia de 1  $\mu$ M VIP a diferentes tiempos. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control.

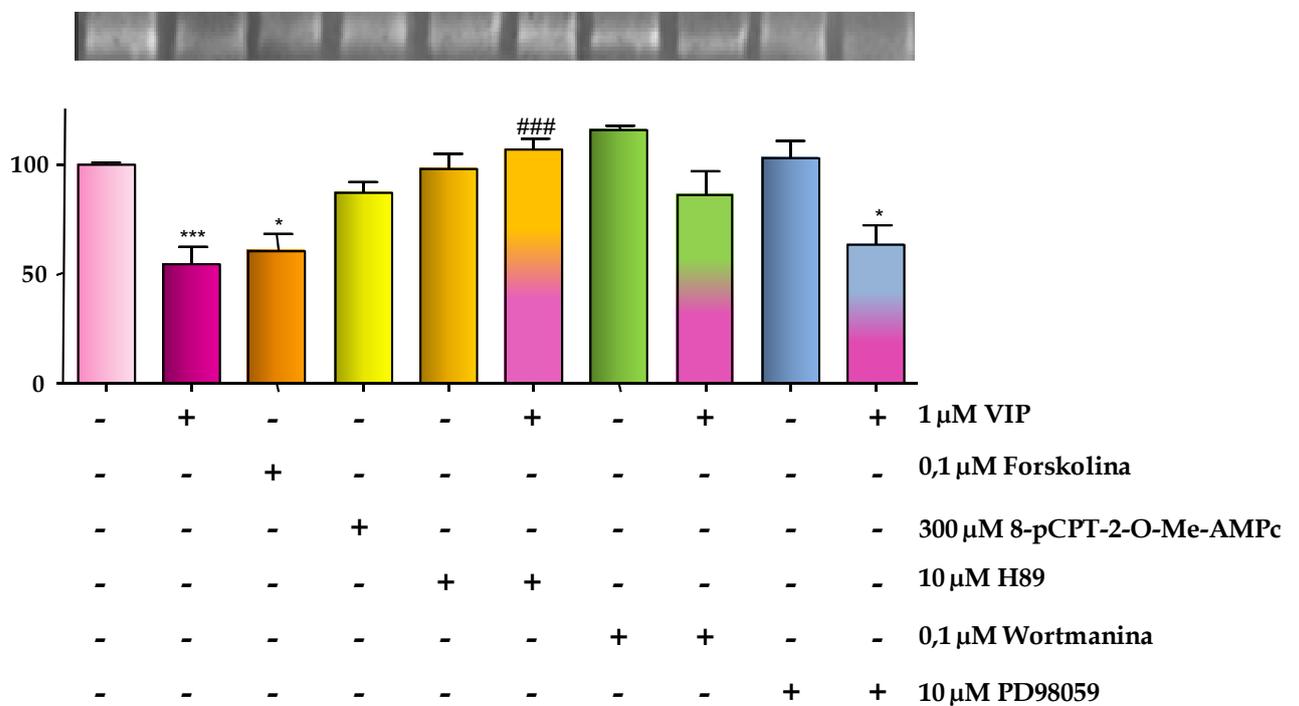
#### 4.3.5.2. Vías de señalización de VIP implicadas en la actividad metaloproteasa en células A498

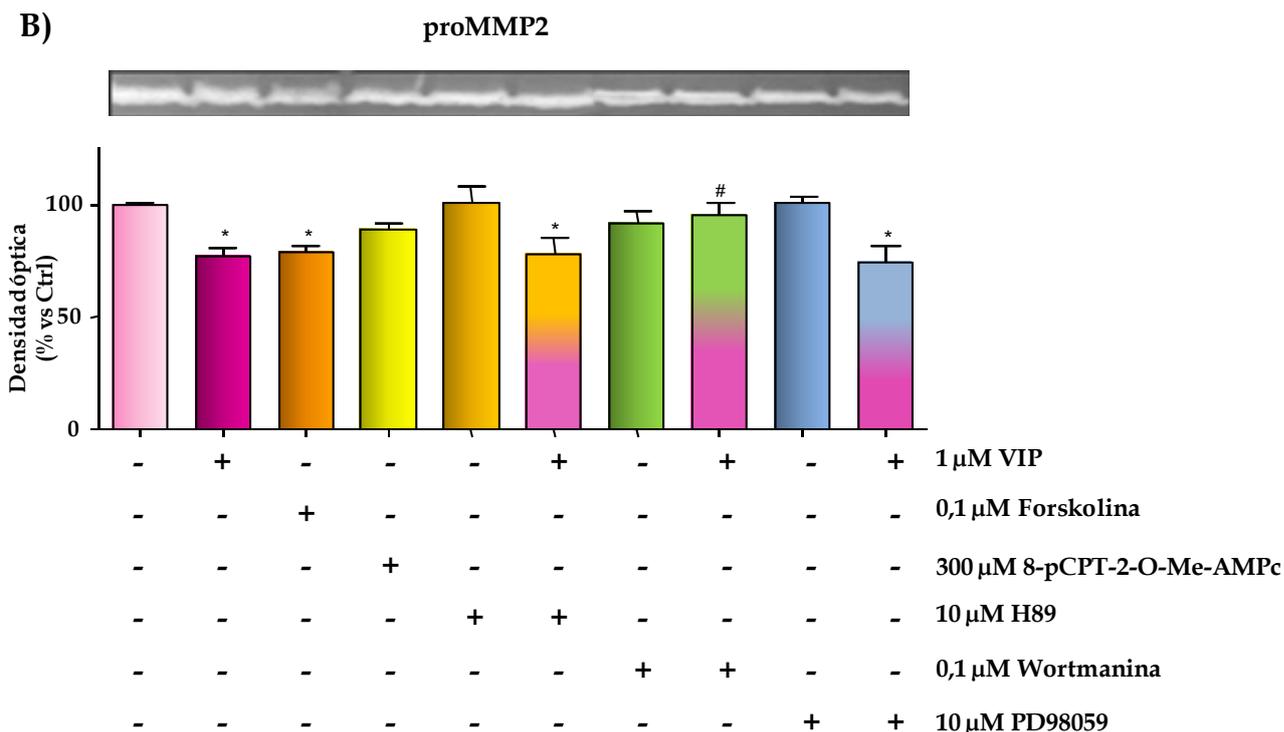
Para conocer las vías implicadas en el efecto de VIP sobre la disminución de la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas en células A498, se realizan tratamientos con agonistas e inhibidores de proteínas quinasas. Así, el tratamiento con forskolina muestra para ambas prometaloproteasas un efecto similar al presentado por VIP (Fig. 63). En cambio, para el tratamiento con 8-pCPT-2'-O-Me-

cAMP no se ve ningún efecto significativo, descartando que el efecto de VIP en las pro-MMP se desencadene a través de EPAC. El tratamiento con los inhibidores de proteína quinasas H89, wortmanina y PD98059, permite conocer la implicación de las proteína quinasas PKA, PI3K y MEK1/2, respectivamente. En la figura 63A se muestra el efecto de los inhibidores, donde H89 ejerce un bloqueo total del efecto de VIP, relacionando a la PKA en la caída de la actividad de la pro-MMP9 mediada por el neuropéptido. En cambio, para la pro-MMP2 es la wortmanina la que impide el efecto de VIP, implicando a la vía PI3K en esta disminución de actividad (Fig. 63B).

A)

proMMP9



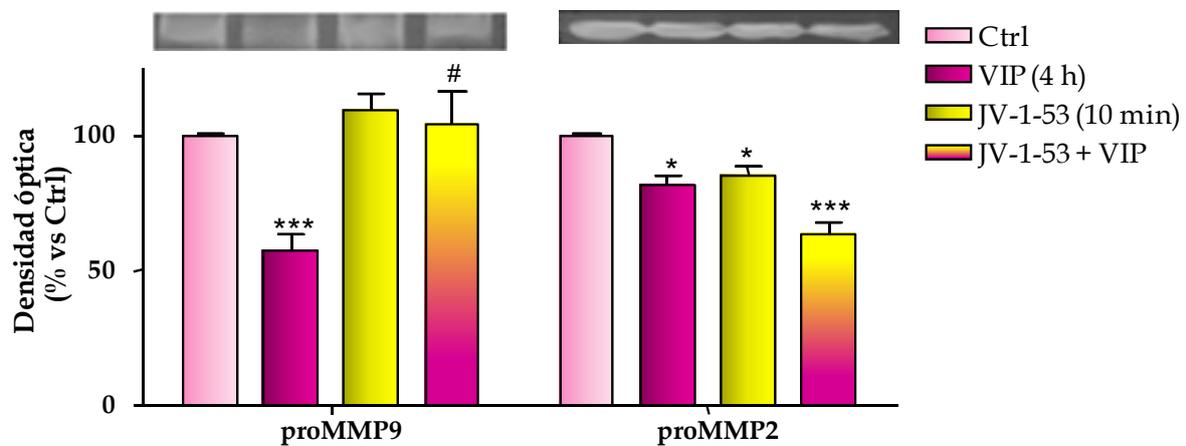


**Figura 63:** Efecto de diferentes agonistas e inhibidores de proteína quinasas en la disminución de la expresión de MMP9 (A) y MMP2 (B) por VIP en células A498, medido por zimografía. Las células se incuban en medio condicionado y se realiza un pretratamiento con los inhibidores a diferentes tiempos: H89 (15 min), wortmanina (30 min) y PD98059 (1h). Posteriormente, las células se incuban 4 h con VIP, forskolina ó 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. Los valores corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control y #  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$  frente a las células tratadas con VIP.

#### 4.3.5.3. Estudio de la implicación de VPAC<sub>1/2</sub> en la acción de VIP sobre las MMP: efecto del antagonista JV-1-53

A continuación, se valora la implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en la disminución de la actividad degradativa que fomenta el tratamiento con VIP. Las células A498 se pretratan con JV-1-53 y se tratan con VIP durante 4 h. En la figura 64 se observa que sólo para la actividad pro-MMP9 el JV-1-53 produce un bloqueo total del efecto de VIP, implicando a los receptores VPAC<sub>1/2</sub>. En cambio, para la pro-MMP2, tanto VIP como JV-1-53, ejercen el mismo efecto y además, el tratamiento conjunto produce una disminución más significativa. En este caso, el

efecto de VIP sobre la pro-MMP2 no parece estar relacionado con el receptor VPAC<sub>1</sub>.



**Figura 64:** Efecto de JV-1-53 en la acción de VIP sobre la disminución de la expresión de las proMMPs, medido por zimografía, en células A498. Las células se incuban en medio condicionado y se pretratan con 0,3  $\mu$ M JV-1-53 (10 min); después las células se incuban 4 h con 1  $\mu$ M VIP. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control y #  $p < 0,05$  frente a las células tratadas con VIP.

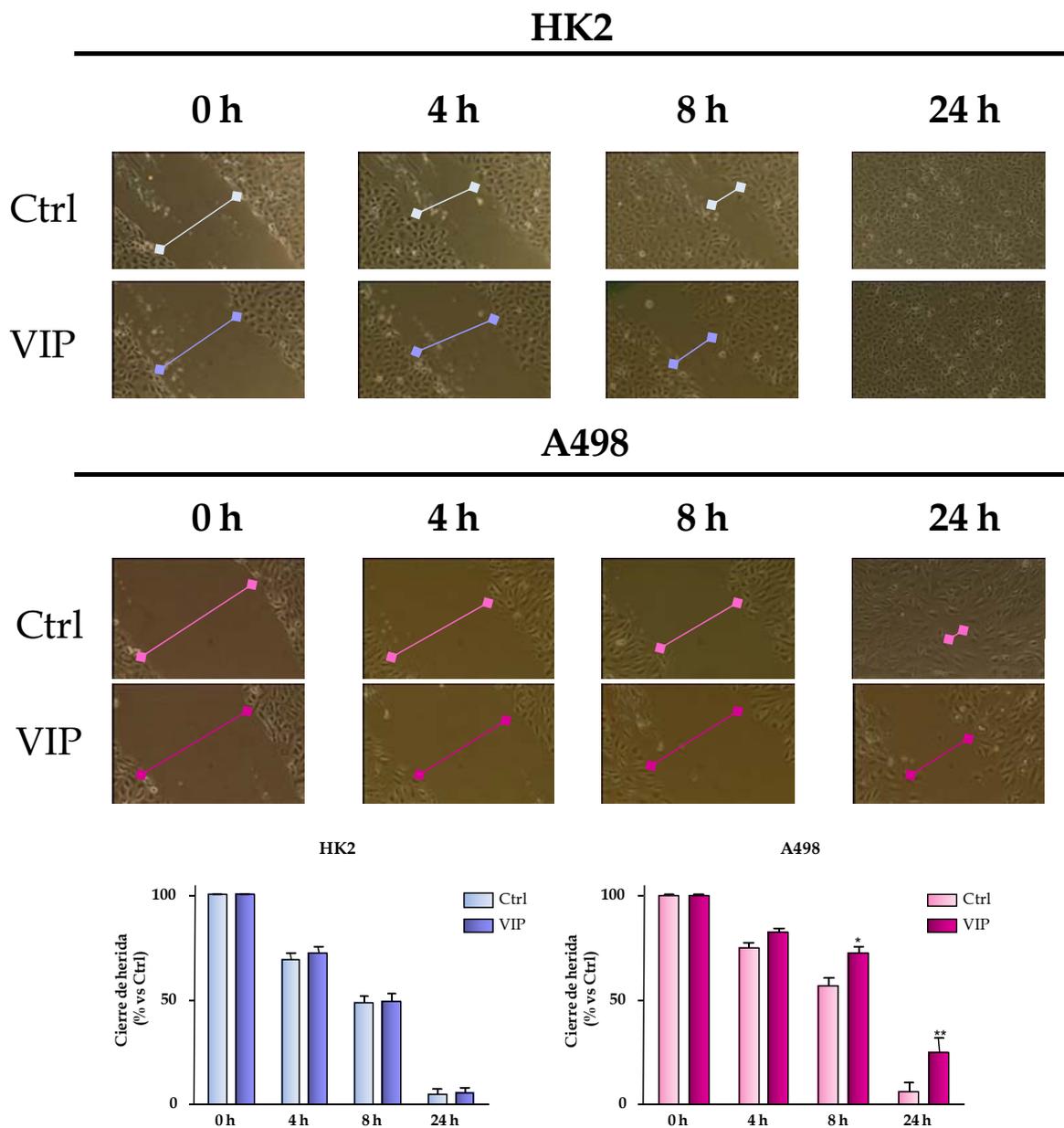
#### 4.3.6. Efecto de VIP en procesos migratorios e invasivos

La capacidad de migrar que adquiere una célula tumoral es uno de los fenotipos más característicos previos a la metástasis. Por esta razón, nos planteamos evaluar si VIP también interviene en este proceso. De este modo se analiza si VIP es capaz de alterar la capacidad migratoria de las células tumorales, así como su desplazamiento e invasión hacia otros órganos.

##### 4.3.6.1. Efecto de VIP en la capacidad de migración en las células de túbulo proximal renal

En este apartado, para estudiar el efecto de VIP sobre la capacidad invasiva de las células renales, se realizan ensayos denominados “cierre de heridas”, que valoran directamente el efecto de VIP sobre la migración celular. Para ello, ambas líneas celulares se tratan con 1  $\mu$ M VIP y se realiza una incisión en el centro del pocillo, considerando este momento como tiempo inicial (0 h). Se realizan

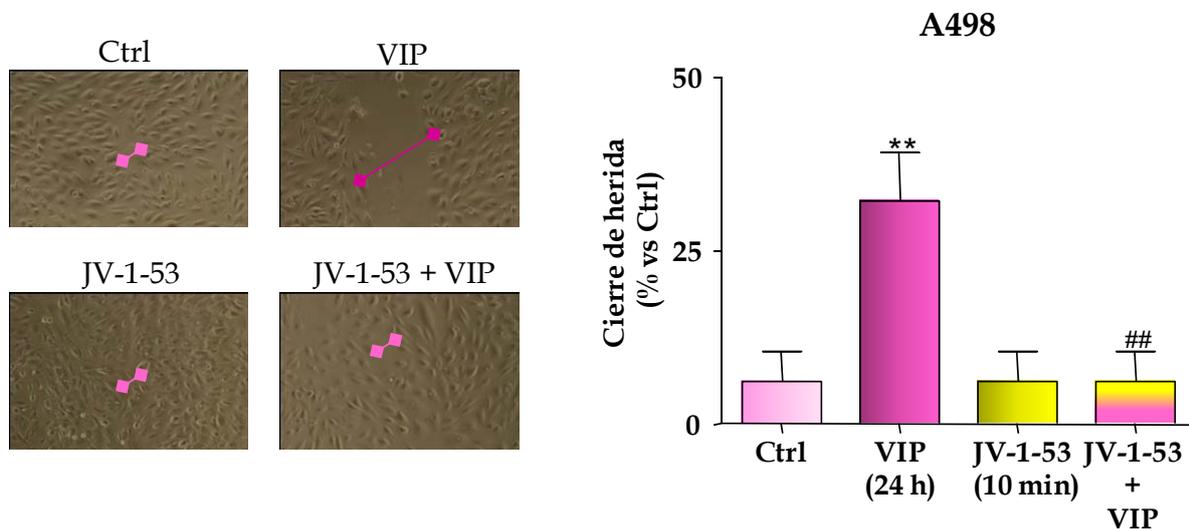
fotografías a diferentes tiempos con el fin de medir si el tiempo de “cierre de heridas” se ve alterado por el neuropéptido. Tras 24 h de tratamiento, se observa que en las células A498, VIP no permite el cierre de la herida, disminuyendo significativamente la migración en las células tumorales, con respecto al control sin tratar donde la herida ya está cerrada. En las células HK2 no se observa ninguna alteración de la migración tras ser tratadas con VIP (Fig. 65).



**Figura 65:** Efecto de VIP en el “cierre de heridas” en células HK2 y A498. En la parte superior se muestran las microfotografías cuyos valores se muestran en la parte inferior. Las células se tratan con 1  $\mu$ M VIP a diferentes tiempos. Los resultados, representativos de tres experimentos independientes, corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; frente al control sin tratar.

#### 4.3.6.2. Implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en el efecto de VIP sobre la capacidad de migración en células A498

En este apartado, se analiza si el antagonista JV-1-53 ejerce algún efecto sobre la disminución de la migración que produce el neuropéptido en células A498. Para ello, las células se pretratan 10 min con el antagonista y, posteriormente, se incuban con VIP durante 24 h. Una vez finalizados los tratamientos, se realizan las fotografías. Como se puede observar en la figura 66, el pretratamiento con JV-1-53 bloquea totalmente la disminución de la migración celular que ejerce VIP sobre las células A498, implicando directamente a los receptores VPAC<sub>1/2</sub>, en este efecto.



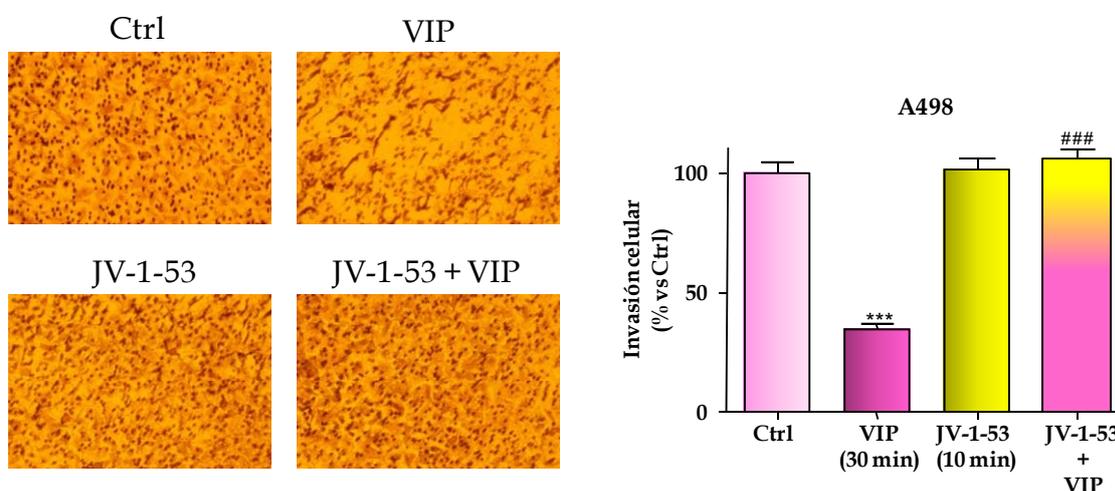
**Figura 66:** Efecto de JV-1-53 en el efecto de VIP sobre el “cierre de heridas” en células A498. Las células se pretratan 10 min con 0,3  $\mu$ M JV-1-53 y se incuban 24 h con 1  $\mu$ M VIP. Los resultados, representativos de tres experimentos independientes, corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*  $p < 0,01$  frente al control sin tratar y ##  $p < 0,01$  frente a las células tratadas con VIP.

#### 4.3.6.3. Efecto de VIP sobre la capacidad invasiva de las células tumorales

La capacidad invasiva de una célula se mide por su facilidad para atravesar la matriz extracelular. El matrigel se utiliza en los ensayos *in vitro* como sustituto de la membrana basal, ya que presenta abundantes proteínas de la matriz extracelular. Basándonos en ello, se realizan ensayos de invasión mediante cámara *transwell* donde se mide la capacidad invasiva de las células A498 por la propiedad que éstas

tienen para atravesar el matrigel. En la figura 67 se puede observar que el tratamiento con VIP es capaz de reducir significativamente, más de un 50%, la invasión de células tumorales.

Para conocer si en esta disminución de la capacidad invasiva generada por VIP están implicados sus principales receptores, las células A498 se pretratan con JV-1-53 y/ó VIP. El resultado obtenido (Fig. 67) muestra que el efecto del neuropéptido se inhibe significativamente por el tratamiento con el antagonista, implicando directamente a los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en la disminución de la invasión mediada por VIP.



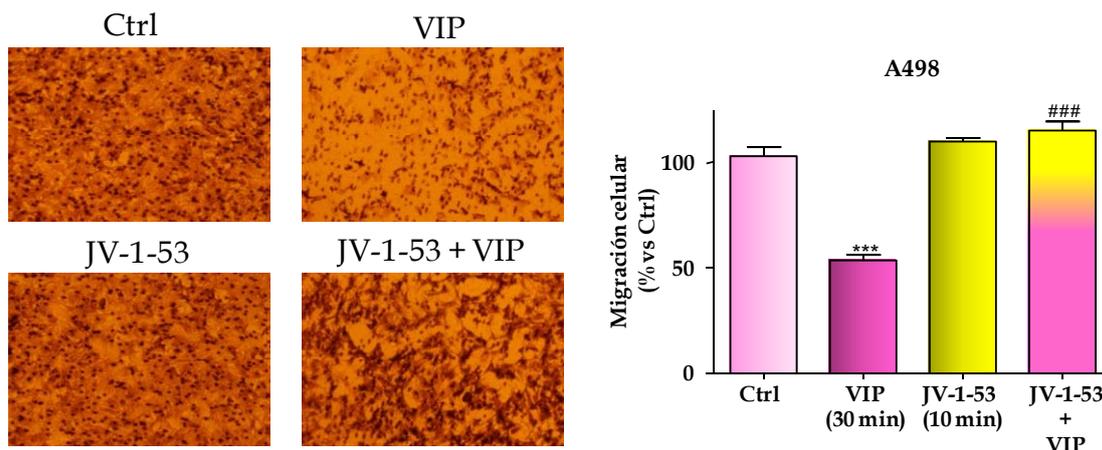
**Figura 67:** Efecto de VIP sobre la capacidad invasiva de células A498. Se muestran las microfotografías de la cara inferior del pocillo transwell. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes; las gráficas representan los resultados de al menos 4 campos escogidos al azar. Las células se pretratan con 0,3  $\mu$ M JV-1-53 (10 min); después, las células fueron tratadas 30 min con 1  $\mu$ M VIP e incubadas 24 h en el pocillo. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*\*  $p < 0,001$ ; frente al control y ###  $p < 0,001$ ; frente a las células tratadas con VIP.

#### 4.3.6.4. Efecto de VIP sobre la capacidad de migración de las células tumorales hacia tejido óseo

El tejido óseo libera colágeno tipo I al torrente sanguíneo debido a la actividad osteoclástica que se produce durante la renovación continuada del hueso. Éste es uno de los principales órganos hacia los que las células de carcinoma renal

suelen metastatizar. Por esta razón, en este ensayo se valora la implicación de VIP en la capacidad de las células A498 de migrar hacia una matriz de colágeno tipo I, que actuará como quimioatrayente. En la figura 68 se observa que el colágeno consigue atraer a las células tumorales, y el tratamiento con VIP es capaz de reducir significativamente el número de células que consiguen migrar.

A continuación, se valora la implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub>, realizando un pretratamiento con el antagonista JV-1-53 y/o el tratamiento con VIP. En la figura 68 se muestra que JV-1-53 impide completamente el efecto del neuropéptido, incrementado el número de células que consiguen migrar hacia el colágeno. Con este resultado se consigue implicar directamente a VPAC<sub>1/2</sub> en esa disminución de la migración de las células tumorales hacia el hueso ejercida por VIP.



**Figura 68:** Efecto de VIP en la migración de células A498 hacia el hueso. Se muestran las microfotografías de la cara inferior del pocillo transwell representativas de tres experimentos independientes; las gráficas representan los resultados de al menos 4 campos escogidos al azar. Las células se pretratan con 0,3  $\mu$ M JV-1-53 (10 min); después las células fueron tratadas 30 min con 1  $\mu$ M VIP e incubadas 24 h en el pocillo. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*\*  $p < 0,001$ ; frente al control y ###  $p < 0,001$  frente a las células tratadas con VIP.

#### 4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE VIP EN UN MODELO *IN VIVO*

Los resultados obtenidos *in vitro* sobre las células tumorales apuntan a un posible efecto inhibitorio del desarrollo tumoral, sin provocar toxicidad en las células no tumorales. Los ensayos *in vivo* con modelos animales se utilizan como etapa previa de un ensayo clínico, ya que permiten comprobar si estos mismos efectos se reproducen en un organismo vivo. Por ello, nos planteamos diseñar un experimento *in vivo* con el fin de confirmar estos interesantes resultados obtenidos con las líneas celulares.

Para realizar los estudios *in vivo* se utiliza un modelo animal con ratones desnudos inmunodeprimidos sobre los que se inoculan las células pretratadas, provocando así tumorigénesis. El ensayo se realiza siguiendo el protocolo mencionado en materiales y métodos, donde se indica que las células, previamente tratadas, fueron inyectadas a nivel subcutáneo. El peso del animal, así como el crecimiento del tumor fueron los parámetros analizados periódicamente.

Los resultados obtenidos en relación al peso de los ratones se muestran en la tabla 10. Los datos obtenidos reflejan un incremento del peso de cada ratón a lo largo del experimento y se puede observar que con ningún tratamiento aparecen variaciones significativas del peso del animal. De este modo, se puede indicar que ni el neuropéptido ni el antagonista ejercen un efecto dañino que pueda repercutir en el peso del animal.

**Tabla 10:** Valores medios del peso corporal (g) de cada uno de los grupos empleados en el experimento el día 3 y el día 18 después de la inoculación de células A498.

Días tras la inyección	Ctrl	VIP	JV-1-53	JV-1-53 + VIP
3	21,7 ± 0,8	20,8 ± 0,7	21,8 ± 0,63	21,3 ± 0,37
18	30,2 ± 1,54	29,7 ± 1,11	29,2 ± 1,4	29,6 ± 1,71



El efecto sobre el volumen tumoral se valora realizando medidas sucesivas que comienzan el día 3, cuando el tumor adquiere el tamaño apropiado para tomar una medida completa (ancho, largo y alto) y finalizan el día 18 cuando se sacrifican los ratones. En todos los casos se observa crecimiento tumoral, pero el grupo tratado con VIP se diferencia en el tamaño del tumor con el resto de grupos. Por ello, se analiza el tiempo que tarda el tumor en duplicar su tamaño (TDT) que se detalla en la tabla 11. Los datos indican que el grupo tratado con VIP tarda más tiempo en duplicar el tamaño tumoral, ya que presenta un incremento significativo del tiempo de duplicación de 1 día con respecto al grupo control.

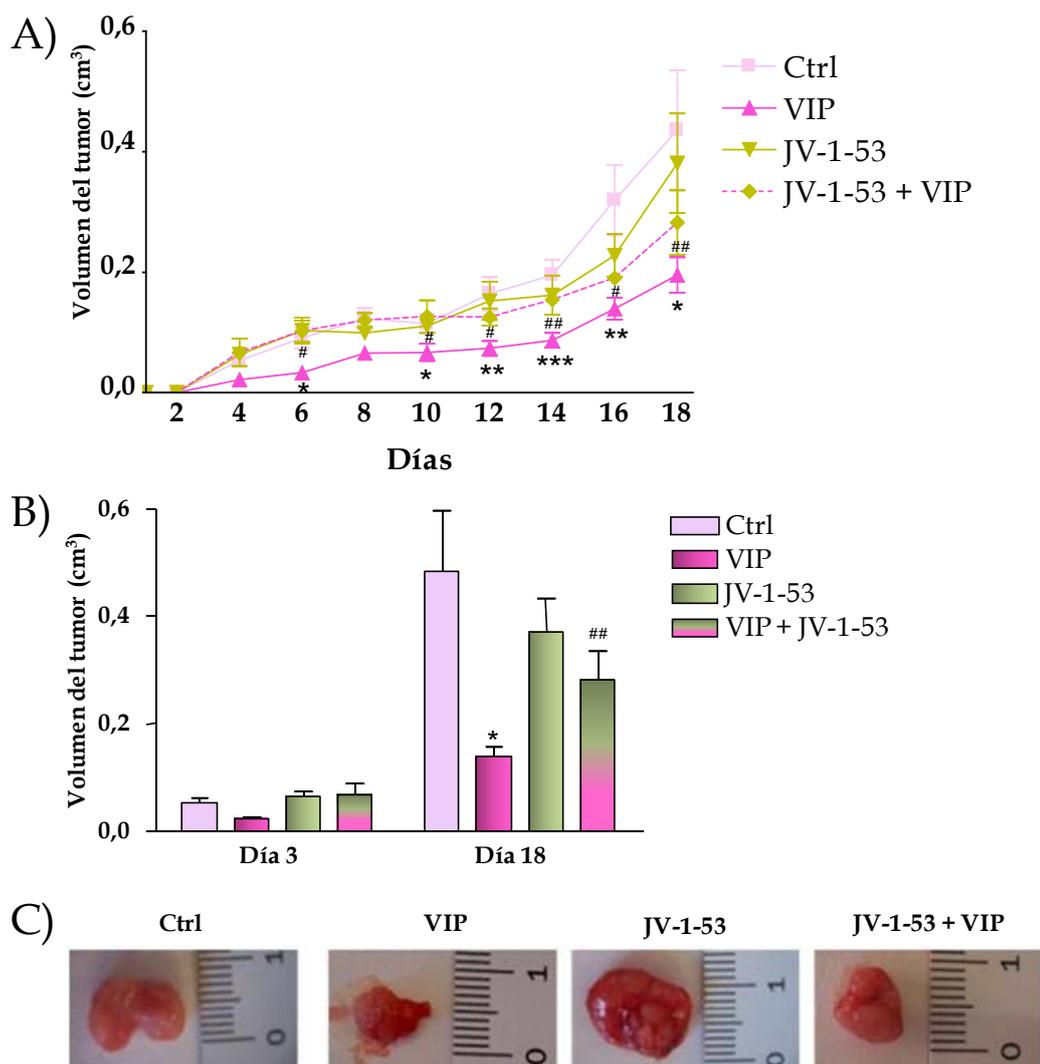
**Tabla 11:** Tiempo medio (días) del crecimiento tumoral que tarda en duplicar el tamaño (TDT).

Ctrl	VIP	JV-1-53	JV-1-53 + VIP
2,95 ± 0,09	3,95 ± 0,3*	3,15 ± 0,17	3,39 ± 0,16

Los valores obtenidos del volumen tumoral con respecto al tiempo se muestran en la figura 69A. Como se puede observar, el grupo 2 donde las células tumorales fueron tratadas con VIP, presentan una inhibición significativa del volumen del tumor con respecto al grupo 1 o control, desde el principio del experimento. El tratamiento previo con el neuropéptido reduce la capacidad de las células tumorales para crecer y desarrollar una masa tumoral. En la figura 69, se comparan específicamente los valores de los días inicial (3) y final (18) (Fig. 69 B), así como se muestran las fotografías representativas de cada uno de los grupos estudiados (Fig. 69 C). Como se puede observar, el grupo control aumenta hasta 5 veces su tamaño, a diferencia del grupo tratado con VIP que no alcanza ni 2 veces su tamaño inicial (Fig. 69 B).

Los efectos de VIP en la disminución del desarrollo tumoral en los ensayos *in vitro*, vienen determinados por la implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub>. Por esta razón, el ensayo se completó con el estudio de la implicación del antagonista JV-1-53, en el desarrollo tumoral *in vivo*. Para ello, las células fueron pretratadas con JV-1-53 y posteriormente, incubadas con VIP. Los resultados obtenidos (Fig. 69)

muestran que el tratamiento con el antagonista revierte significativamente el efecto del neuropéptido sobre el desarrollo tumoral. En la figura 69B, la comparación entre el inicio y el final del ensayo manifiesta claramente el efecto sobre el volumen tumoral de todos los grupos estudiados. De este modo, los receptores VPAC<sub>1/2</sub> estarían implicados en el posible efecto antitumoral que ejerce VIP en CCR.



**Figura 69: Volumen tumoral en ratones macho inmunodeprimidos tras inyección subcutánea de células A498. A:** Progresión del volumen tumoral a lo largo del experimento. **B:** Comparación de las medidas de los volúmenes tumorales en los días 3 y 18 del experimento. **C:** Fotografías representativas de cada grupo de tratamiento. Las células se pretratan con 0,3  $\mu$ M JV-1-53 (10 min), después las células fueron incubadas 2 h con 1  $\mu$ M VIP antes de la inyección. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control y #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  frente a VIP.



## 4.5. ESTUDIO DEL PAPEL PROTECTOR DE VIP

Tras constatar que VIP, en la línea celular tumoral, ejerce efectos que podrían suponer un potencial papel anti-metastásico, nos plantemos valorar si en la línea celular no tumoral el neuropéptido ejercía algún efecto protector tras estrés oxidativo o en condiciones inflamatorias. Para ello, las células HK2 se sometieron a tratamientos con agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) o con lipopolisacárido (LPS).

### 4.5.1. Efecto de VIP en el daño celular generado por $H_2O_2$

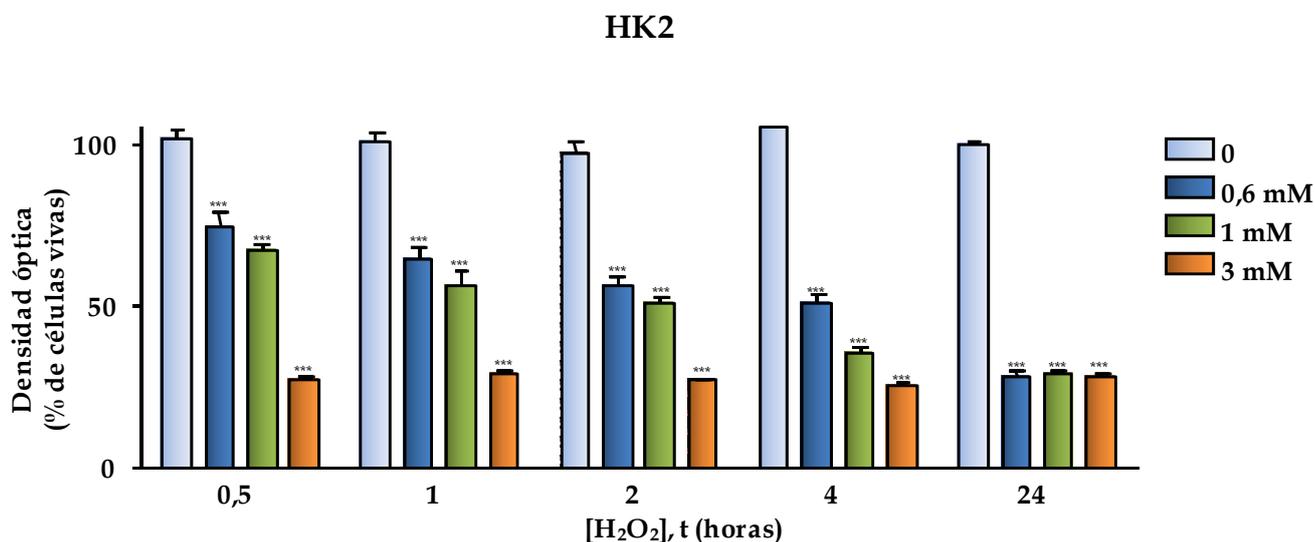
El estrés oxidativo es uno de los principales factores implicados en la mayoría de procesos fisiopatológicos, y juega un papel importante en el desarrollo de patologías renales (Horvath y col., 2011b; Yuan y col., 2011). Por lo tanto, la disminución del estrés oxidativo es una buena estrategia para proteger las células frente a los estímulos nocivos.

Dada la gran importancia del estrés oxidativo en las patologías renales, nos propusimos investigar el efecto de VIP ante una situación de daño ocasionado por un agente externo, el  $H_2O_2$ . Para ello, se realiza un análisis previo del efecto del  $H_2O_2$  en las células HK2, con el fin de determinar la concentración idónea de  $H_2O_2$ , sin provocar muerte integral, y posteriormente se procede a valorar el efecto del neuropéptido sobre los efectos provocados.

#### 4.5.1.1. Ensayos de viabilidad con $H_2O_2$

Se realizan ensayos de MTT para determinar la concentración de  $H_2O_2$  adecuada para conseguir un daño oxidativo sin perder la viabilidad celular. Para ello, las células se tratan con 0,6, 1 ó 3 mM de  $H_2O_2$ , durante 1 h. En la figura 70 se muestra la curva dosis respuesta de  $H_2O_2$ , donde se observa que, en tan solo 30 min de tratamiento, se produce una pérdida del número de células viables a todas las concentraciones analizadas. El efecto más acentuado se encontró a las 24 h. Como se observa en la figura 70, la concentración 0,6 mM de  $H_2O_2$  es la menos agresiva para las células y produce efectos significativos; por tanto, es la concentración elegida

para los posteriores experimentos. En relación al tiempo de exposición, tanto en 30 min como a 1 h los efectos son muy similares, por ello, al no verse alteradas las células en este periodo, se realiza el tratamiento durante 1 h.



**Figura 70:** Efecto de la concentración y del tiempo de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la viabilidad de células HK2, medida por ensayo MTT. Los resultados se expresan en porcentaje de células vivas comparadas con el control sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y son representativos de tres experimentos independientes. Los valores corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control no tratado.

#### 4.5.1.2. Efecto de VIP en la muerte celular generada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

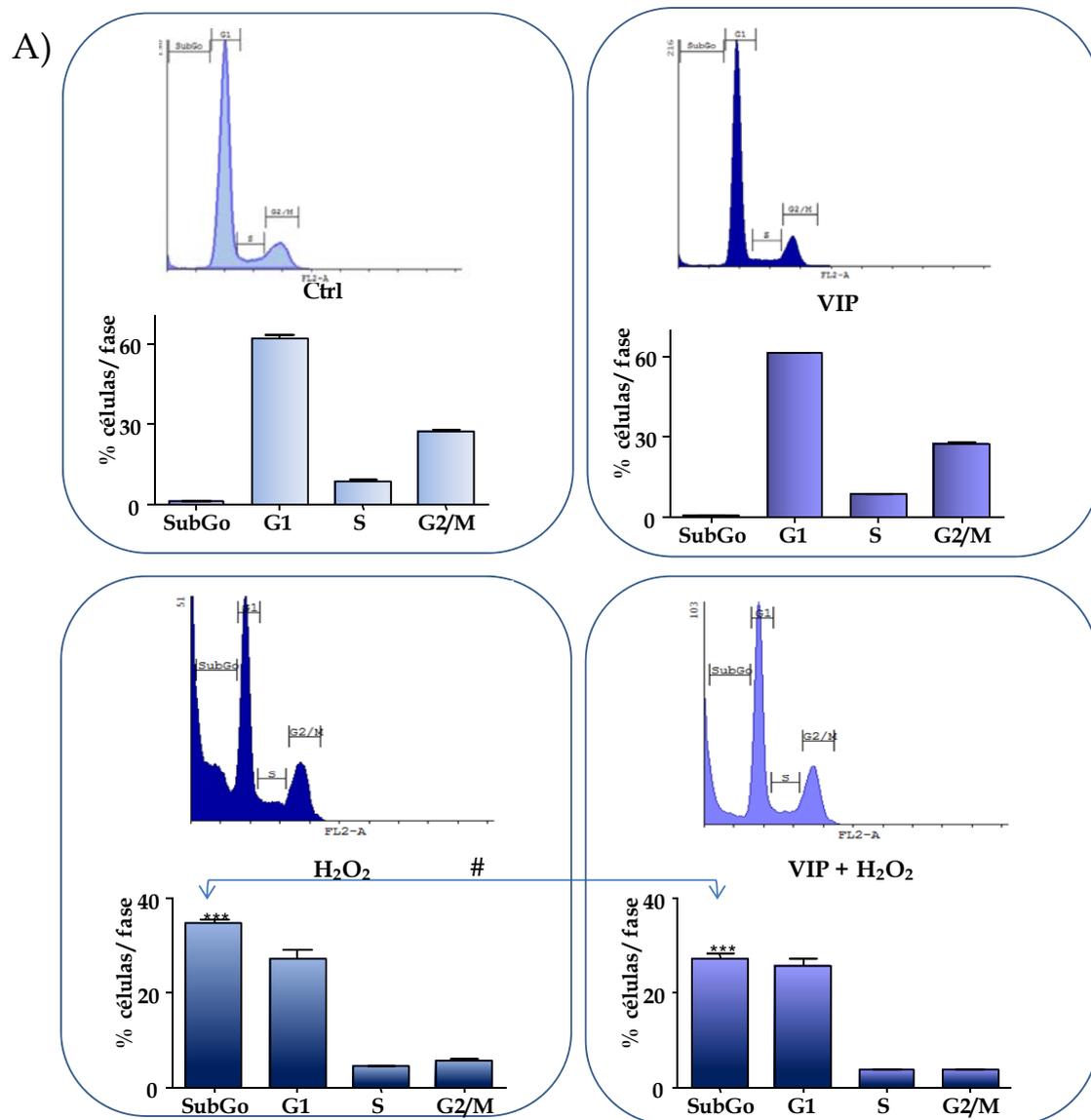
Una vez determinada la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> óptima para disminuir la viabilidad celular, nos planteamos valorar si VIP podía modificar este efecto. De este modo, se realizan ensayos de ciclo celular para determinar muerte celular además de valorar el efecto sobre la expresión de proteínas implicadas en apoptosis.

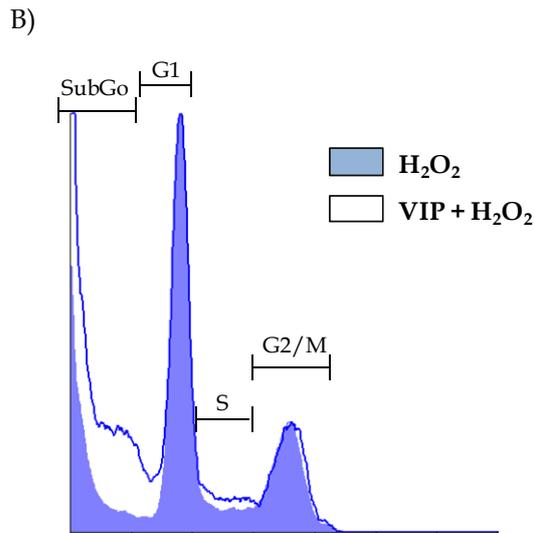
##### 4.5.1.2.1. Efecto de VIP sobre el ciclo celular

Para ello, las células HK2 se tratan durante 24 h con VIP (1  $\mu$ M) y posteriormente, se les añade 0,6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los ensayos de ciclo celular con IP permiten diferenciar las fases del ciclo celular según su contenido en DNA, siendo en la fase SubGo, donde el DNA ha sufrido daños y su material genético es hipodiploide (<2n). En la figura 71 se observa que el número de células en la fase SubGo, correspondientes a células en apoptosis, no se ve alterado si se tratan sólo

con el neuropéptido. En cambio, las células incubadas con  $H_2O_2$  presentan niveles elevados de células apoptóticas. Si las células previamente se incuban con el neuropéptido, este incremento del número de células apoptóticas se ve significativamente disminuido.

De modo comparativo, en la figura 71B se representan los histogramas de las células HK2 tratadas con  $H_2O_2$  y/ó VIP, en la que se contrastan los niveles de ambos tratamientos.

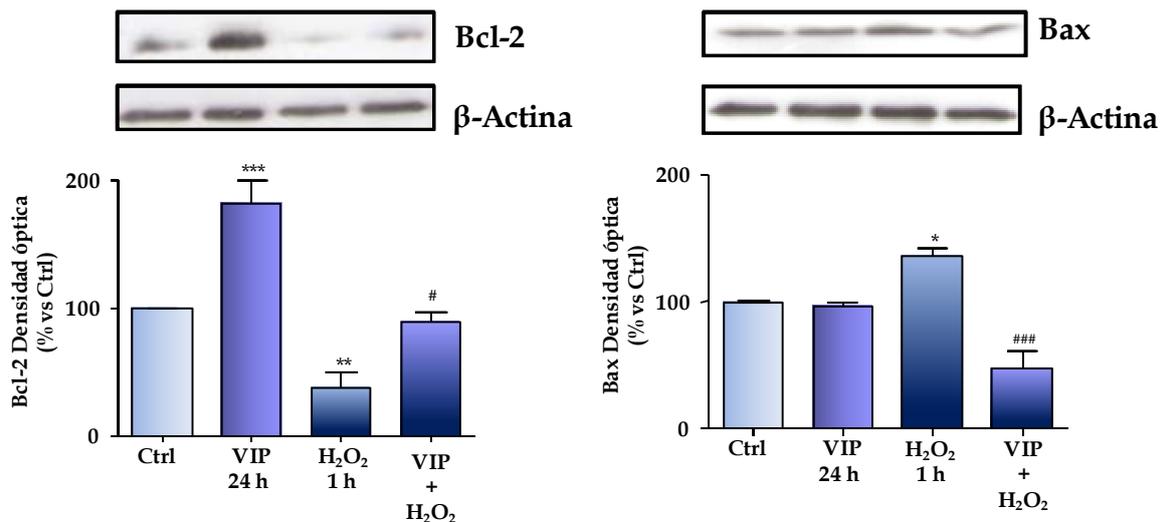




**Figura 71: Análisis del ciclo celular en células HK2 tratadas con VIP y/ó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Los resultados se muestran como el % de células, en cada fase del ciclo, frente al control sin tratar. Todos los resultados corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., de tres experimentos independientes \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control no tratado y #  $p < 0,05$  frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.5.1.3. Efecto de VIP sobre proteínas pro- y antiapoptóticas

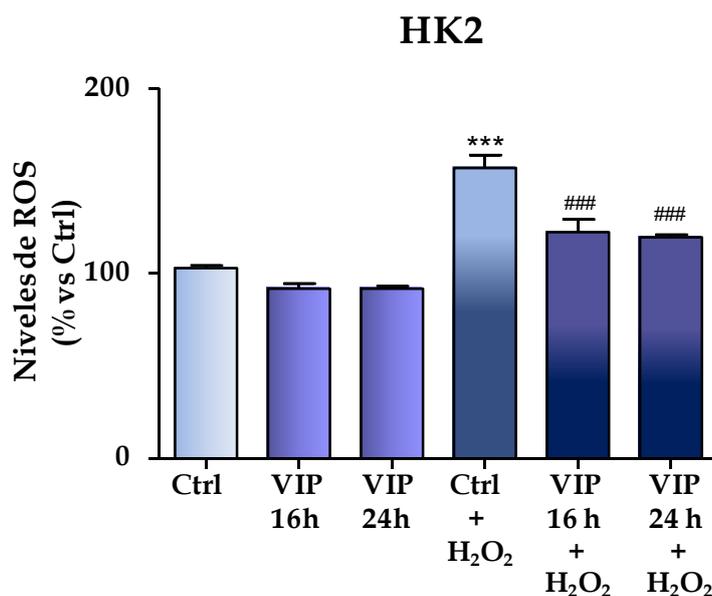
Una vez valorado el efecto de VIP sobre la apoptosis generada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nos propusimos conocer su papel sobre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas. Para ello se analizan por inmunodetección los niveles de expresión de la proteína antiapoptótica, Bcl-2 y de la proapoptótica, Bax. Así, en la línea celular HK2 (Fig. 72), el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce una disminución de los niveles de Bcl-2 y un incremento de la expresión de Bax. El pretratamiento con el neuropéptido es capaz de revertir significativamente los bajos niveles de expresión Bcl-2 inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Más acusado se observa el efecto del pretratamiento con VIP sobre los niveles de Bax, puesto que no solo revierte el efecto sino que provoca una disminución en los niveles superando los rangos fisiológicos (Fig. 72). VIP lleva a una desregulación del balance entre moléculas pro y anti-apoptóticas que previene a la célula frente al estrés oxidativo que provoca apoptosis.



**Figura 72:** Niveles de expresión de proteínas antiapoptóticas, Bcl2 y proapoptóticas, Bax, medidos por “western blot” en células HK2, tratadas con VIP y/ó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes y son la media  $\pm$  E.M.S., \* p< 0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001 frente al control no tratado, y # p< 0,05; ### p< 0,001 frente al control con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.5.1.4. Efecto de VIP en el estrés oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

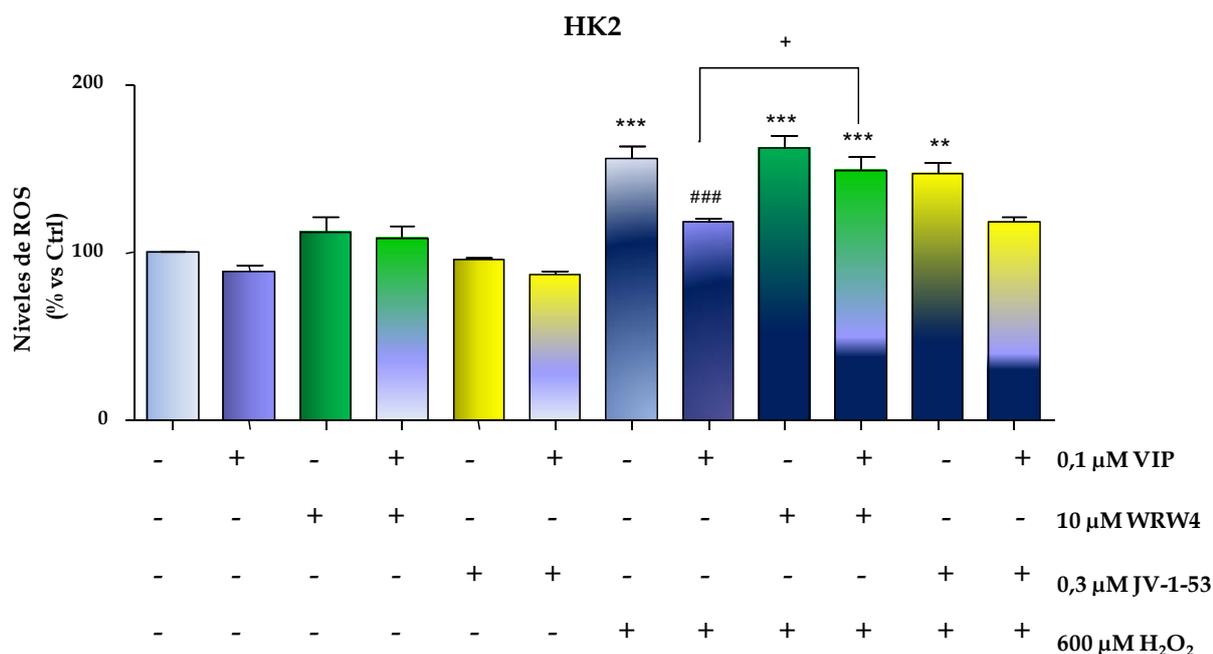
En este apartado no propusimos valorar el efecto de VIP sobre los niveles de ROS que se generan tras el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello, las células se tratan con VIP durante 16 y 24h, y posteriormente se incuban 30 min con la sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA. El efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los niveles celulares de ROS endógenos se consigue con un pulso de 5 seg con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como se puede observar en la figura 73, existe un incremento significativo de producción de ROS intracelular cuando las células tienen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El pretratamiento con VIP, tanto a las 16 h como a las 24 h, reduce significativamente los niveles endógenos de ROS inducidos por el pulso con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, relacionando al neuropéptido con un posible efecto antioxidante.



**Figura 73:** Niveles de ROS medidos por sonda de fluorescencia, en células HK2 tratadas con VIP (16-24 h), y /6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 seg). Los resultados son la media de fluorescencia por célula y se muestran como el porcentaje de fluorescencia con respecto al control sin tratar. Los valores son representativos de tres experimentos independientes correspondientes a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*\*  $p < 0,001$  frente al control no tratado y ###  $p < 0,01$  frente a las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.5.1.5. Implicación de los receptores de VIP en el estrés oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En este apartado se valora la implicación de los receptores VPAC<sub>1</sub> y FPRL1 en el efecto de VIP sobre el incremento de ROS inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así, las células HK2 fueron pretratadas con WRW4 (antagonista de FPRL-1) y/o JV-1-53 (antagonista de VPAC<sub>1</sub>) e incubadas con el neuropéptido durante 16 y 24 h. Tras el estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observa que el antagonista WRW4 es el único capaz de impedir el efecto de VIP sobre la disminución de los niveles de ROS intracelulares (Fig. 74). Este resultado implica directamente al receptor FPRL-1, y no a VPAC<sub>1</sub> en el posible papel antioxidante del neuropéptido.



**Figura 74:** Niveles de ROS medidos por sonda de fluorescencia, en células HK2 tratadas con VIP (24 h), WRW4 (30 min), JV-1-53 (10 min) y /6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 seg). Los resultados son la media de fluorescencia por célula y se muestran como el porcentaje de fluorescencia con respecto al control sin tratar. Los valores corresponden a la media ± E.M.S., de tres experimentos independientes, \*\*\* p< 0,001; \*\* p< 0,01 frente al control no tratado y ###p< 0,001 frente al control con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y +p< 0,05 frente a las células tratadas con VIP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

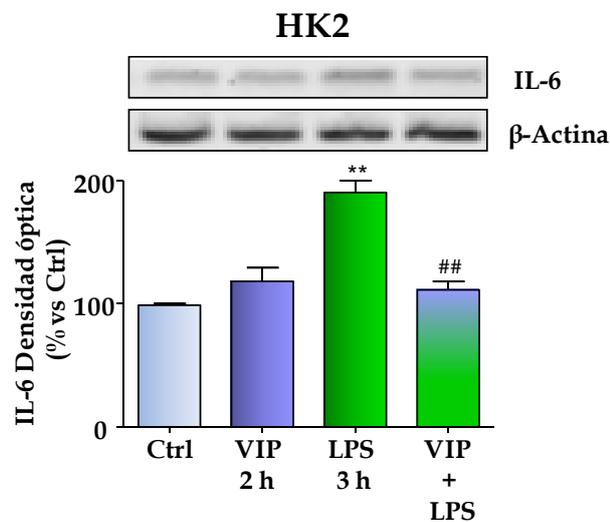
#### 4.5.2. Efecto de VIP en el tratamiento con LPS

La sepsis se caracteriza por la liberación de citoquinas proinflamatorias que están asociadas a los daños que se observan tanto en tejido renal como en endotelio, efectos que se producen cuando hay una lesión renal aguda (LRA) (Heemskerk y col., 2006; Schreiber y col., 2012). El lipopolisacárido (LPS) es una endotoxina derivada de bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*) y está considerado uno de los más potentes estímulos para la activación de la respuesta inmune (Rossol y col., 2011). Existen diferentes ensayos *in vivo* e *in vitro*, en los que se utiliza LPS como modelo de daño renal agudo inducido por endotoxemia (Zhong y col., 2011; Cui y col., 2011). Se sabe que el estímulo con LPS produce inflamación y desencadena la activación de factores de transcripción como STAT3 o NFκB (Ben Mkaddem y col., 2010; Rossol y col., 2011).

En este apartado, nos propusimos estimular las células HK2 con LPS, y determinar así el efecto de VIP sobre algunas de las moléculas efectoras que se activan por este importante factor inflamatorio.

#### 4.5.2.1. Efecto de VIP en la expresión de IL-6 generada por LPS

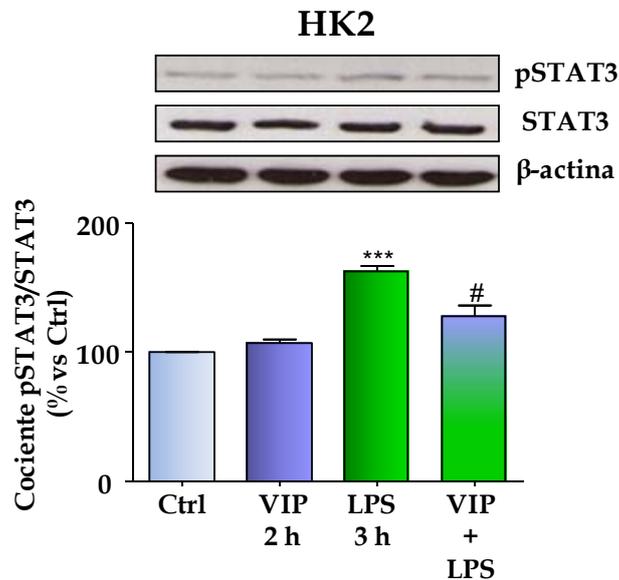
Dado que LPS genera un entorno inflamatorio, es importante medir los niveles de expresión de IL-6. Para ello, se valoran por RT-PCR semicuantitativa los niveles de ARNm de IL-6 expresados tras el pretratamiento con 1  $\mu$ M VIP, durante 2 h y la posterior incubación durante 3 h con 1  $\mu$ g/ml LPS. Los resultados reflejan un incremento en la expresión de ARNm para IL-6 tras el tratamiento con LPS. El pretratamiento con VIP reduce significativamente los elevados niveles de expresión que induce la endotoxina, manifestando así un efecto anti-inflamatorio del neuropéptido (Fig. 75).



**Figura 75:** Niveles de IL-6 en células HK2 tratadas con VIP y/o LPS, medidos por RT-PCR semicuantitativa. Se utiliza  $\beta$ -actina como control de carga. Los resultados, representativos de tres experimentos independientes, corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*  $p < 0,01$  frente al control sin tratar, ##  $p < 0,01$  frente a las células tratadas con LPS.

#### 4.5.2.2. Implicación de VIP en el incremento de pSTAT3 generado por LPS

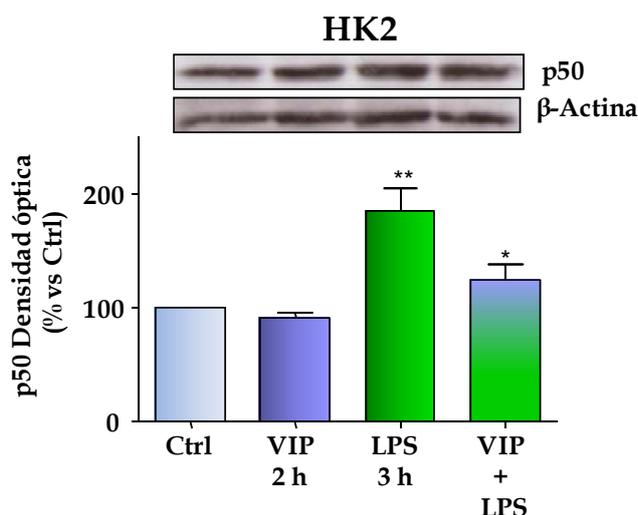
Una vez valorada la expresión de IL6, se procede al análisis de uno de sus principales efectores, STAT3. Se realizan ensayos de “western blot” con anticuerpos específicos para la detección de la forma STAT3 fosforilada. Las células HK2 se pretratan 2 h con VIP 1  $\mu$ M, y después se incuban 3 h con 1  $\mu$ g/ml de LPS. Como se muestra en la figura 76, la incubación con LPS genera elevados niveles del cociente pSTAT3/STAT3. El pretratamiento con VIP bloquea parcialmente esta relación estabilizando los niveles de activación de STAT3 tras un shock séptico en las células no tumorales. Estos datos confirman los resultados obtenidos en el apartado anterior, donde VIP atenúa la expresión del ARNm de IL-6 inducida por LPS.



**Figura 76:** Niveles de expresión y activación de STAT3 medidos por “western blot” en células HK2, tratadas con VIP y/o LPS. Los resultados representativos de tres experimentos independientes se muestran como el porcentaje con respecto al control. Los valores corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*  $p < 0,01$  frente al control sin tratar, ##  $p < 0,01$  frente a las células tratadas con LPS.

#### 4.5.2.3. Implicación de VIP sobre la inducción de expresión de p50 por LPS

Como se ha analizado en el apartado 4.2.2 las células HK2 presentan niveles de expresión basales de p50 a nivel nuclear. Para valorar cambios en esa expresión nuclear de p50, se realizan ensayos de “western blot” con los anticuerpos específicos. Estos ensayos requieren de un tratamiento previo durante 2 h con VIP 1 $\mu$ M, y posteriormente se incuban 3 h con 1 mg/ml de LPS aislando finalmente las fracciones citosólicas y nucleares. Como se muestra en la figura 77, LPS produce un incremento significativo de los niveles nucleares de p50, que son significativamente revertidos en las células pretratadas con VIP. Estos resultados implican directamente a VIP como una molécula capaz de revertir el incremento de NF $\kappa$ B inducido por endotoxemia.



**Figura 77:** Ensayos de inmunodetección de p50 nuclear, en células HK2 tratadas con VIP y/o LPS.

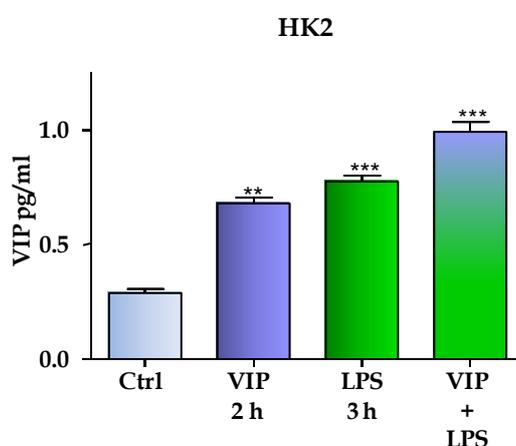
Los resultados, representativos de tres experimentos independientes, se muestran como el porcentaje de la expresión con respecto a su control. Los valores corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., \*\*  $p < 0,01$  frente a su control y #  $p < 0,05$  frente a las células tratadas con LPS.

#### 4.5.2.4. Regulación del sistema receptor-efector de VIP en condiciones inflamatorias

Existen numerosos factores físicos y moleculares implicados en el inicio del proceso inflamatorio. Tras conocer el papel de VIP sobre diferentes moléculas activadas por LPS en células HK2, nos planteamos conocer si esta endotoxina afecta al sistema de señalización del VIP (péptido y receptores).

##### 4.5.2.4.1. Efecto de LPS en los niveles citosólicos de VIP

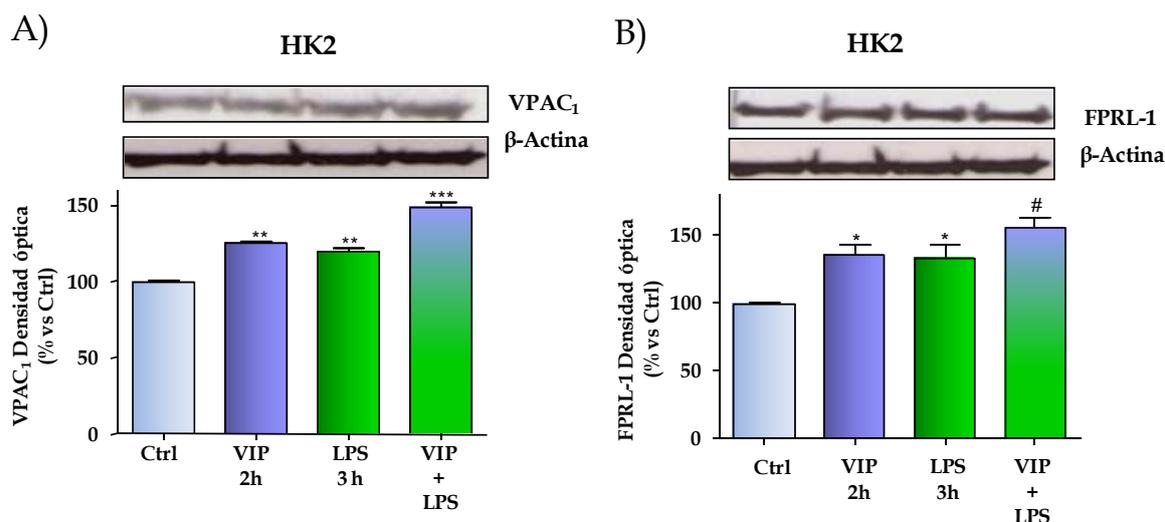
Para estudiar si LPS regula la síntesis del neuropéptido en las células HK2, se realizan ensayos de ELISA analizando la expresión citosólica de VIP. Los resultados observados en la figura 78 muestran que tras el tratamiento con LPS, los niveles citosólicos de VIP aumentan, casi tres veces, con respecto a los obtenidos a partir de las células no tratadas.



**Figura 78:** Niveles citosólicos del neuropéptido valorados mediante ELISA tras el tratamiento con VIP 1  $\mu$ M y/o 1  $\mu$ g/ml LPS, en células HK2. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  E.M.S., de tres experimentos independientes; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  frente al control.

#### 4.5.2.4.2. Efecto de LPS en la expresión de los receptores VPAC<sub>1</sub> y FPRL-1

Una vez comprobado que LPS estimula la síntesis del neuropéptido nos planteamos conocer el efecto sobre los receptores VPAC<sub>1</sub> y FPRL-1 realizando ensayos de “western blot”. En la figura 79A se muestra que las células estimuladas con LPS tienen incrementados los niveles del receptor VPAC<sub>1</sub>. Si además, las células se pretratan con VIP durante 2 h, y posteriormente se incuban con la endotoxina durante 3 h, se observa un incremento significativo de la expresión de VPAC<sub>1</sub>, que supera a los niveles obtenidos con el tratamiento individual. En la figura 79B, se muestra el efecto sobre el receptor FPRL-1. Como se puede observar, el efecto bajo las mismas condiciones experimentales que para VPAC<sub>1</sub>, es prácticamente similar para FPRL-1, por lo que se puede considerar que, tras endotoxemia, se “up-regulan” ambos receptores.



**Figura 79:** Niveles de expresión de los receptores VPAC<sub>1</sub> (A) y FPRL-1 (B) medidos por “western blot” tras el tratamiento con VIP 1 μM y/ó 1 μg/ml LPS. Los resultados, correspondientes a tres experimentos independientes, se muestran como el porcentaje de la expresión con respecto al control sin tratar. Los valores representan la media ± E.M.S., \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 frente al control,

## **5. Discusión**



En este trabajo de investigación, se estudia la implicación de los receptores y las vías de señalización de VIP en la progresión del CCR, así como su posible efecto en el daño renal no tumoral.

Para llevar a cabo el estudio, se han utilizado muestras de tejido renal fresco e incluido en parafina, y modelos *in vitro* e *in vivo*. Para realizar los ensayos *in vitro*, se han utilizado dos líneas celulares de túbulo proximal renal representativas de un estadio no tumoral, HK2, y tumoral de CCR de células claras, A498. Con el fin de conseguir una aproximación más real del efecto de VIP sobre la oncogénesis, se han realizado experimentos *in vivo* con un modelo animal de ratones atímicos, inyectados con células tumorales A498 para inducir el crecimiento tumoral.

El primer objetivo analizado revela para VIP un patrón diferente de expresión en función del tipo de CCR. Así, se muestra una disminución significativa de la expresión de VIP en tejido de pacientes con CCR de células claras con respecto al tejido sano, que no se aprecia en los tumores de tipo papilar. Esta disminución es más significativa en las muestras de pacientes cuya enfermedad se encuentra en un estadio más avanzado, por lo que se podría pensar que la producción endógena de VIP se ve disminuida a medida que la enfermedad se vuelve más agresiva. Se trata de un resultado opuesto a lo descrito por nuestro grupo de investigación en muestras humanas de tejido tumoral de próstata y mama, en las que se ha demostrado una producción del neuropéptido más elevada en comparación con el tejido no tumoral (Collado y col., 2005a; Valdehita y col., 2010).

El estudio de la expresión de los receptores de VIP muestra que VPAC<sub>1</sub> es el único receptor que se expresa tanto en tejido renal no tumoral como tumoral. En ambos tipos de muestras se observa una localización nuclear del receptor, resultado que coincide con la localización de VPAC<sub>1</sub> en tejido de próstata y mama descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación, lo que concuerda además con resultados descritos para otros GPCRs, como es el caso de los receptores para el ácido lisofosfatídico, glutamato, apelina, factor



derivado de plaquetas, bradiquinina B2, angiotensina II, endotelina, somatostatina, hormona paratiroidea y neurotensina, para los que se ha encontrado una localización nuclear (Fernández-Martínez y col., 2012; Valdehita y col., 2010; Bkaily y col., 2000; Marrache y col., 2002; Gobeil y col., 2003; Gobeil y col., 2006). Del análisis del grado de expresión de VPAC<sub>1</sub> entre el tejido tumoral y no tumoral renal se encuentra que no hay diferencias en su expresión entre ambas muestras, por lo que la expresión del receptor no parece un hecho determinante en la progresión de la enfermedad. Tal vez, estudios de funcionalidad y afinidad revelarían diferencias significativas entre las muestras afectadas por el tumor y el tejido normal.

Con el fin de continuar la caracterización del sistema de VIP en riñón y poder profundizar en la señalización implicada, se utilizó un modelo *in vitro*. Para ello, las líneas celulares no tumorales, HK2, y tumorales, A498, se utilizaron como modelo. Hay que resaltar que este trabajo es pionero en la caracterización del sistema de VIP en células renales control y tumorales; se aporta con este estudio el análisis tanto de los niveles del péptido, como la expresión, localización y funcionalidad de sus receptores, y su implicación en diferentes fenotipos celulares relacionados con la progresión tumoral.

El análisis de expresión de VIP revela que ambas líneas celulares expresan el neuropéptido, siendo los niveles de expresión significativamente más altos en las células tumorales si se comparan con la línea celular no tumoral. La síntesis de VIP se ha descrito también en diferentes tipos celulares como timocitos, células del endotelio corneal, neuronas y fibroblastos, así como en células de origen epitelial donde, al igual que en nuestros resultados en células renales, la producción de VIP es mayoritaria si las células son de origen tumoral (Delgado y col., 1999; Koh y Waschek, 2000; Nishimoto y col., 2011; Juarranz y col., 2008; Jönsson y col., 2011; Moody y Gozes, 2007). Resultados previos de nuestro grupo de investigación lo avalan, revelando niveles de VIP elevados en diferentes líneas celulares tumorales de próstata (LNCaP y PC3) y de mama (T47D y MDA-MB-468) (Juarranz y col., 2001; Gutiérrez-Cañas y col.,

2003; Valdehita y col., 2012). Se trata de un resultado opuesto al encontrado en las muestras de tejido renal no tumoral, ya que los niveles de expresión de VIP son más elevados que en las de tejido tumoral, pudiendo ser debida esta discrepancia entre el tejido y las líneas celulares a que las células se obtienen de un carcinoma de células claras de un individuo concreto y son sistemas aislados, lo que dificulta la extrapolación de resultados en tejido con los de células.

En este trabajo se ha estudiado la expresión de los receptores VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub> y FPRL-1 y no la de PAC<sub>1</sub> (receptor de baja afinidad para VIP) cuyo estudio ha sido abordado extensamente por el grupo de Arimura (Arimura y col., 2006; Li y col., 2008). Así, se ha observado una distribución mayoritariamente nuclear de VPAC<sub>1</sub> en ambas líneas celulares, resultado similar al obtenido en tejido. En cambio, cuando se realiza una comparación entre las dos líneas celulares, se comprueba que los niveles de expresión de VPAC<sub>1</sub> son significativamente más elevados en células HK2 que en células A498, lo que puede interpretarse en base a que los niveles elevados de VIP en las células tumorales hacen que la propia célula, al disponer de una mayor señal, resuelva eficazmente con menor número de receptores. La expresión de VPAC<sub>2</sub> se observa en ambas líneas celulares aunque presenta una expresión muy débil. El análisis del receptor FPRL-1 indica una diferencia clara de expresión entre ambas líneas celulares, ya que está presente sólo en la membrana plasmática de las células HK2. La ausencia de FPRL-1 tanto en células tumorales como en tejido renal tumoral podría deberse a una posible pérdida de función fisiológica provocada por el desarrollo del carcinoma. Un hecho similar se ha descrito por Jönsson y col. (2012) en colonocitos humanos donde se llega a perder la expresión de VIP y disminuye a su vez la expresión de VPAC<sub>1</sub> a valores mínimos cuando la colitis ulcerosa se cronifica; Juarranz y col. (2008) describen también una disminución de la síntesis de VIP en fibroblastos humanos durante una enfermedad inflamatoria crónica. En cambio, hasta el momento no se ha descrito la pérdida de FPRL-1 tras enfermedad, aunque está descrita su expresión en una gran variedad de tipos celulares



normales como leucocitos, hepatocitos, linfocitos T, células endoteliales y epiteliales y en células tumorales de neuroblastoma, astrocitoma y pulmón (Strouse y col., 2009; Cattaneo y col., 2011). Con estos resultados, se llega a la conclusión evidente de que el receptor que se expresa con mayor intensidad en **ambas líneas celulares es VPAC<sub>1</sub>**, mientras que la expresión de VPAC<sub>2</sub> es marginal. Muchos tumores expresan VPAC<sub>1</sub>; en cambio, la expresión de VPAC<sub>2</sub> en tumores es mucho más rara, aunque se ha encontrado en alta proporción en tumores gastrointestinales (Reubi y col., 2000; Reubi y col., 2004).

Una vez realizada la caracterización molecular de los receptores de VIP, se procede al **análisis de su funcionalidad** en células HK2 y A498. Así, el estudio del principal efector de los receptores VPAC<sub>1/2</sub>, la enzima **adenilato ciclasa**, revela que en ambas líneas celulares se alcanzan los mismos niveles de AMPc tras el tratamiento con VIP. Este hecho es interesante, pues refleja que los receptores VPAC<sub>1/2</sub> son funcionales tanto en células renales control como en células tumorales, dato relevante ya que indica un mantenimiento de la funcionalidad de los receptores en células tumorales renales, al igual que lo observado previamente por nuestro laboratorio para otras líneas celulares tumorales de próstata y mama (Collado y col., 2005; Valdehita y col., 2007).

La localización nuclear de VPAC<sub>1</sub>, no debería afectar a la funcionalidad del receptor ya que trabajos previos de nuestro grupo, muestran que en células de mama la estimulación de AMPc es muy similar en membranas y en núcleos, por lo que serían necesarios experimentos posteriores que permitan valorar de manera directa la funcionalidad del receptor VPAC<sub>1</sub> nuclear (Valdehita y col., 2010). Además, el análisis del sistema VIP/receptor/efector se completa con el efecto regulador que el tratamiento con VIP exógeno produce sobre dicho sistema, demostrando que el neuropéptido VIP estimula su propia expresión y secreción, así como la expresión de su receptor VPAC<sub>1</sub> en ambas líneas celulares, y del receptor FPRL-1 en células HK2. El mecanismo de autorregulación de VIP se ha descrito previamente en nuestro grupo en células tumorales de mama (T-47D y MDA-MB-468) además de observarse por otros

grupos en células del epitelio bronquial (BEC) (Valdehita y col., 2010; Qin y col., 1999). Se demuestra así, que VIP podría ejercer un bucle autocrino que retroalimenta su propia síntesis y la de sus principales receptores.

La búsqueda de genes diana que controlen el crecimiento y progresión tumoral ha dado como resultado el descubrimiento de los oncogenes. **NFkB** y **STAT3**, podrían ser considerados oncogenes ya que son factores de transcripción clave implicados en diferentes procesos tumorigénicos que se encuentran activados en células neoplásicas y controlan la expresión de genes implicados en proliferación celular, supervivencia y angiogénesis (Grivennikov y Karin, 2010). Ambas moléculas presentan un papel muy relacionado con el desarrollo tumoral, existiendo una clara relación con el carcinoma de células renales (Guo y col., 2009; Dordevic y col., 2008). El análisis de la expresión de la subunidad p50 de NFkB muestra que tanto en células HK2 como en células A498, hay p50 en el núcleo. Parece sorprendente encontrar niveles basales de p50 en el núcleo de las células no tumorales ya que esta localización se ha relacionado con procesos tumorales; tal vez p50 controle los niveles basales de proliferación en células de túbulo proximal, o quizás pueda ser que las células HK2, al ser una línea celular inmortalizada, presenten los sistemas de control de la proliferación alterados. La línea celular **A498**, carente de la proteína VHL, tiene aumentados los niveles nucleares de NFkB, al ser éste un regulador negativo (Morais y col., 2011); en cambio, no está descrito que **VIP disminuya** en esta línea celular los **niveles nucleares de p50 (NFkB1)** como se demuestra en este trabajo. Este resultado es prometedor ya que NFkB está sobreexpresado en CCR y su inhibición está relacionada con la disminución tanto de la translocación nuclear como de la proliferación en células ACHN y VMRC-RCW de CCR; sin embargo, hasta el momento, estos modelos no se han podido trasladar satisfactoriamente a ensayos *in vivo* (Morais y col., 2011).

La activación de STAT3 depende de su fosforilación, y el tratamiento con VIP produce una **disminución del cociente pSTAT3/STAT3 en células A498**, al



impedir la fosforilación de STAT3. Este es un resultado concordante con el recientemente descrito en células hepáticas HepG2, en las que VIP ha demostrado el mismo efecto de disminución de la expresión génica de STAT3 (Absood y col., 2008). De este modo, el neuropéptido podría estar implicado, a través de la reducción de pSTAT3, en la disminución de la proliferación de las células tumorales ya que se ha descrito que la activación constitutiva de STAT3 conduce a la transformación celular, crecimiento y metástasis del hepatocarcinoma celular humano (Aggarwall y col., 2009; Wang y col., 2011).

La implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en la disminución de la activación de ambos factores de transcripción que produce el tratamiento con VIP, se demuestra al tratar las células A498 con el antagonista selectivo, JV-1-53 y comprobar que es capaz de inhibir significativamente la **translocación nuclear de p50 y la fosforilación de STAT3** que produce VIP, **implicando** a los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en este efecto. El análogo sintético de GHRH, JV-1-53, presenta una mayor afinidad por los receptores VPAC<sub>1/2</sub> que por los receptores de GHRH (Rekasi y col., 2000). Ensayos previos de nuestro grupo de investigación muestran que JV-1-53 inhibe un 60% la activación de la enzima adenilato ciclasa en células de próstata humanas, y es capaz de bloquear la transactivación de HER en células de próstata y mama (Collado y col., 2005a; Sotomayor y col., 2007; Valdehita y col., 2009).

Una vez comprobado que VIP puede ejercer su acción en las células tumorales A498, por inhibición de la activación de dos factores de transcripción directamente implicados en el desarrollo tumoral, nos propusimos conocer la implicación de VIP en cada uno de los pasos que llevan a las células renales a progresar hacia una situación de mal pronóstico como son la proliferación celular, el estrés oxidativo, la angiogénesis, la adhesión celular y la capacidad de metástasis en células de CCR.

Uno de los primeros fenotipos que adquiere una célula tumoral es una capacidad proliferativa aberrante. Los resultados revelan un efecto **antiproliferativo de VIP en la línea celular tumoral**, sin alterar la capacidad

proliferativa de la línea celular no tumoral, efecto que podría deberse a la disminución de la expresión de NFkB y/o STAT3. En cuanto a las rutas de señalización implicadas en esta disminución de la proliferación se demuestra que VIP disminuye la capacidad proliferativa a través de un incremento de AMPc que a su vez estimula a EPAC, vía PKA independiente y por **activación de la vía de PI3K**. Efectos similares se han observado en células hepáticas, donde VIP produce una disminución de la proliferación celular mediada por un incremento de AMPc (Absood y col., 2008). El uso del antagonista selectivo JV-1-53 y del silenciamiento génico del receptor VPAC<sub>1</sub>, revelan que la reducción de la capacidad proliferativa de las células A498 es ejercida por VIP a través de su receptor mayoritario VPAC<sub>1</sub>. El silenciamiento del receptor VPAC<sub>1</sub> se ha descrito en diferentes líneas celulares epiteliales de riñón (HEK293), de próstata (RWPE-1) y en células tumorales de mama dependientes (T47D) e independientes de estrógenos (MDA-MB-468) provocándose una disminución drástica de la proliferación en las células tumorales de mama con su silenciamiento (Casanueva y col., 2008; Fernández-Martínez y col., 2010; Valdehita y col., 2012).

A pesar de no encontrar señal indicadora de parada de ciclo celular tras el tratamiento con el neuropéptido, ni efectos que pudieran ser tóxicos para las células tumorales, el análisis de la expresión de la proteína oncosupresora p53 muestra que VIP produce un incremento de su expresión y una disminución de los niveles de PCNA en células tumorales, mecanismos que podrían justificar directamente la disminución de la proliferación que produce el tratamiento con VIP. Además, el neuropéptido produce un incremento de la producción endógena de ROS únicamente en las células A498, sin alterar los niveles en las células HK2. Por tanto, es posible que la disminución de la proliferación provocada por el **incremento de p53** y la **disminución de PCNA** pueda deberse a un **incremento** previo de los niveles de **ROS** intracelulares, activándose entonces los mecanismos de defensa celular y llevando a una **disminución de la proliferación** de las **células tumorales**. Finalmente, la relación entre proliferación y ROS se deduce al comprobar que el incremento de ROS que



produce VIP en las células A498 utiliza la misma vía de señalización que para disminuir la proliferación, una vía independiente de PKA: AMPc/EPAC/PI3K. Está descrito que altas concentraciones de ROS pueden provocar la activación y estabilización de la proteína p53; así, la reactivación de p53 en tumores de ratones carentes de la proteína supresora provoca una regresión completa del tumor (Trachootham y col., 2008). Efectos similares se han observado con agentes antitumorales basados en el incremento de ROS cuyos niveles estimulan p53 y en el CCR se sabe que presenta una alta sensibilidad a los prooxidantes (Gupta y col., 2011; Sourbier y col., 2010). Además, STAT3 actúa como represor de la expresión de p53 y la inhibición de NFkB induce apoptosis por incremento de la expresión de p53 (Grivennikov y Karin, 2011). De este modo, el efecto de VIP sobre la disminución de la activación de estos factores de transcripción y el incremento de ROS generaría un aumento de p53 responsable de la disminución de la proliferación en células tumorales sin provocar efectos perjudiciales en las células normales mediante la vía independiente de PKA (VIP/ $\uparrow$ AMPc/ $+$ PI3K/ $\downarrow$ STAT3/ $\downarrow$ NFkB).

La **angiogénesis** es un proceso esencial para el crecimiento y metástasis tumoral en el que la vía de señalización de VEGF parece ser la principal implicada. En particular, se piensa que la señalización mediada por VEGF es importante para el CCR, ya que se ve desregulada por la pérdida de la proteína VHL (Bhargava y Robinson, 2011). En este trabajo se valora el efecto de VIP sobre la expresión y secreción de la isoforma **VEGF<sub>165</sub>** y se analizan sus valores basales en ambas líneas celulares. Los resultados obtenidos muestran una mayor expresión de VEGF<sub>165</sub> en las células tumorales con respecto a las células control. Se trata de un resultado lógico, ya que la línea celular A498 procede de CCR de células claras, carentes de la proteína reguladora VHL, que puede incrementar los niveles de expresión de VEGF a través del incremento de HIF (Oya, 2009). El efecto del tratamiento con VIP que encontramos en este estudio muestra que, en las células normales **HK2**, el neuropéptido incrementa tanto sus niveles de expresión como de secreción, indicando así, que VIP podría desempeñar un efecto activador de la angiogénesis a nivel del túbulo proximal,

concordante con el hecho de que el riñón es un órgano altamente vascularizado donde la activación de angiogénesis podría ser necesaria durante procesos fisiológicos como el funcionamiento del glomérulo renal (Bates, 2010). Así, VIP lleva a un incremento de VEGF en células epiteliales no tumorales (HaCaT), y ejerce un efecto beneficioso tras un proceso de isquemia cerebral activando angiogénesis (Yu y col., 2010; Yang y col., 2009). El grupo de Fernández-Martínez y col., (2011; 2012), considera un efecto protector en células renales HK2 al incremento de VEGF a través de la activación de HIF, en condiciones de normoxia.

El tratamiento con **VIP** en células **A498** produce, en cambio, una **disminución** de los elevados niveles de **expresión** de **VEGF** en estas células, así como de su **secreción al medio extracelular**. Se trata de un resultado prometedor, ya que la mayoría de ensayos clínicos para el CCR se basan en la inhibición de VEGF (Wright y Kapoor, 2011; Cáceres y Cruz-Chacón, 2011; Pirrota y col., 2011; Posadas y Figlin, 2012). VIP podría ejercer este efecto antiangiogénico a través del incremento en la expresión de p53, ya que está descrito que dicho factor de transcripción regula la expresión de VEGF. Así, ocurriría en CCR lo mismo que en células de glioblastoma, donde la delección de p53 incrementa la sobreexpresión de VEGF, disminuyendo ésta cuando se revierte la delección (Reuter y col., 2010). Se ha comprobado que en células de CCR VHL negativas (786-O, RCC4 y A498), la expresión de p53 es independiente de VHL, por lo que VIP podría ejercer un efecto beneficioso en el carcinoma de células claras incrementando p53 (Stickle y col., 2010). Las vías de señalización implicadas en este efecto antiangiogénico de VIP se relacionan con un aumento de AMPc que, en este caso, no parece implicar a EPAC ni a PKA, por lo que posiblemente pueda ser debido a un incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular (como otro de los segundos mensajeros que se activan a través de VIP), en el que estaría implicada la vía PI3K. La participación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en el efecto antiangiogénico mediado por VIP queda demostrada a través del uso del antagonista selectivo JV-1-53.



Durante la transformación hacia un carcinoma invasivo, las células epiteliales sufren modificaciones en su morfología y capacidad adherente, pierden su polaridad y se diferencian en un fenotipo con mayor motilidad y capacidad invasiva (Reuter y col., 2010). Por ello, en este trabajo se estudia el efecto **de VIP** sobre la capacidad de adherencia celular observándose un **aumento de la capacidad adherente** únicamente de las células tumorales **A498** posiblemente relacionada con la **disminución de la expresión de  $\beta$ -catenina nuclear**, a través de receptores **VPAC<sub>1/2</sub>**, por vía PKA independiente, mediante estímulo de **EPAC** y activación de la vía **PI3K**, observando además que no se producen cambios en la adherencia de las células HK2. Estos resultados indican que VIP induce a las células tumorales a que se adhieran a la matriz, disminuyendo el número de células con capacidad de invasión. Además, varios estudios demuestran que la pérdida de VHL en CCR de células claras, puede inducir la capacidad invasiva celular, provocando la pérdida de E-cadherina, facilitando la separación de las células epiteliales, y permitiendo la migración celular (Evans y col., 2007; Lineham y col., 2009). Así, el tratamiento con VIP puede revertir un cambio desde un fenotipo migratorio, típico de las células tumorales, hacia un fenotipo estacionario que se suele encontrar en células epiteliales normales.

Los procesos finales para que las células tumorales metastaticen son la migración celular, la invasión y la colonización de nuevos tejidos. Así, la degradación de la matriz extracelular por MMPs facilita la metástasis y por ello, se ha valorado el efecto de **VIP** sobre la **expresión de MMP-2 y 9** en ambas líneas celulares, mostrando un efecto **inhibitorio en las células tumorales**. La disminución de la expresión de MMP-9 se realiza a través de los receptores **VPAC<sub>1/2</sub>**, de modo que el consiguiente incremento de AMPc produce la activación de PKA. En cambio, el efecto sobre la expresión de MMP-2 se produce con la señal de AMPc y la activación de PI3K, aunque no se ha podido relacionar directamente con los receptores **VPAC<sub>1/2</sub>**. Se podría considerar que esta diferencia en las vías de activación puede estar determinada por la divergencia en la regulación que presentan ambas MMPs en el CCR. Tal y como

se indicó en la Introducción, la MMP-9 es inducible y parece estar regulada a nivel transcripcional, mientras que la MMP-2 es constitutiva y se regula a nivel postranscripcional (Cho y col., 2003; Chuang y col., 2008). Posiblemente, por esta razón, el efecto más significativo de VIP sobre la disminución de MMP-2 se produce a tiempos más largos, indicando que VIP pueda regular directamente a la MMP-9, y que la disminución de la expresión de la MMP-2 pueda ser debida a señales derivadas de algún efecto tardío.

Los efectos de VIP sobre la migración celular, sobre la invasión y sobre la migración hacia hueso indican que VIP no modifica dichos procesos en las células HK2. Sin embargo, en las células A498 el resultado fue muy distinto, ya que el **neuropéptido disminuye la capacidad migratoria de las células tumorales** y produce una **disminución significativa tanto de la invasión como de la migración hacia hueso**. Además, se comprueba la implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en este efecto, postulándose claramente dichos receptores como dianas terapéuticas para la inhibición del fenotipo metastásico de las células de CCR. Así, dado que el receptor VPAC<sub>1</sub> es el único receptor que se expresa en pacientes con CCR, podríamos proponer una sobreexpresión del receptor, con herramientas de biología molecular, para potenciar los efectos beneficiosos de VIP sobre proliferación, angiogénesis y metástasis en células tumorales renales.

Una vez demostrado que VIP es capaz de disminuir la capacidad tumorigénica de las células tumorales renales y confirmada la ausencia de toxicidad de las células no tumorales, nos propusimos realizar un ensayo *in vivo*, para corroborar los resultados tan prometedores encontrados. El uso de ratones inmunodeprimidos permite el desarrollo de células tumorales humanas en estos animales. Así, se observa que el crecimiento de la masa tumoral se inició en tan solo 2 días después de inocular las células tumorales y todos los grupos desarrollaron tumor, alcanzando en menos de 3 semanas un tamaño de masa tumoral de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, al igual que en otros grupos de investigación que han utilizado esta misma línea celular como modelo de



inducción tumoral (Zhang y col., 2011). Los resultados obtenidos con ratones (apartado 4.4 de resultados) confirman que **VIP ralentiza el desarrollo tumoral**, representando la primera descripción de un efecto antitumoral de VIP, en un modelo animal. Los tumores tratados con el neuropéptido presentan una disminución significativa (30%) de su crecimiento tumoral, siendo aparente desde el comienzo del desarrollo. Falta esclarecer los mecanismos por los cuales VIP hace este efecto *in vivo*, pero probablemente sean debidos a la activación de p53 o a la disminución de los niveles de NFkB/STAT3 observados previamente en nuestros ensayos *in vitro*. El uso del antagonista selectivo JV-1-53 implica directamente a los receptores VPAC<sub>1/2</sub> en la reducción tumoral que produce VIP. Se ha descrito que el tratamiento solo con JV-1-53 reduce el tamaño tumoral un 67%, y es capaz de disminuir la expresión de los oncogenes c-fos y c-jun en tumores de células PC3 (Plonowski y col., 2002); en cambio, en tumores de células A498 no se han observado efectos significativos sobre el tamaño tumoral. Estos resultados apoyan los ensayos previos *in vitro* y permiten afirmar que los receptores VPAC son unas buenas dianas para el desarrollo de moléculas terapéuticas. En la actualidad, se han diseñado nuevos péptidos derivados de VIP cuya diana específica son los receptores VPAC, pero presentan el inconveniente de que su vida media es demasiado corta y son de difícil utilización en clínica humana (Couvineau y Laburthe, 2012b).

Una vez valorado el efecto del neuropéptido en el desarrollo tumoral por ensayos *in vivo* e *in vitro*, nos planteamos como objetivo valorar su posible acción sobre procesos que se desencadenan tras estrés oxidativo o un entorno inflamatorio, causantes ambos de la mayoría de las patologías renales.

Nuestros resultados muestran que en las células de túbulo proximal **HK2** sometidas a estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **VIP tiene un efecto protector**, ya que reduce el número de células apoptóticas y los niveles de ROS que genera el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en comparación con las células no pretratadas. El efecto antiapoptótico se ratifica mediante el análisis de los niveles de proteínas implicadas en la apoptosis, Bcl-2 y Bax. Efectos similares se han descrito en células renales tratadas con

PACAP38, donde el tratamiento con  $H_2O_2$  reduce significativamente la viabilidad celular, siendo PACAP38 capaz de revertir este efecto (Horvath y col., 2011b). El papel preventivo de VIP frente a la apoptosis se ha observado en otras líneas celulares tales como células neurales (Castorina y col., 2008). En cuanto al efecto de disminución de los niveles de ROS que produce VIP, es indicativo de que el neuropéptido podría desencadenar señales que actuaran como acción antioxidante. El incremento de radicales libres en el riñón es clave en la etiología de enfermedades como isquemia-reperfusión, inflamación y fármacos. En respuesta a dicho estrés, las diferentes células renales presentan diferentes reacciones. Así, en el caso de las células del túbulo proximal, son más sensibles al estrés oxidativo que las de túbulo distal, y tienden a sufrir apoptosis y necrosis (Percy y col., 2008). Datos de la literatura de diferentes ensayos *in vivo* revelan para VIP un efecto preventivo frente al daño por estrés oxidativo. Así, VIP presenta un efecto neuroprotector bajo condiciones neurotóxicas, ya que reduce el daño cerebral en ratas isquémicas, efecto relacionado con la disminución de apoptosis; además, VIP protege significativamente el tejido neuronal del estrés oxidativo y la apoptosis en un modelo de ratas tratadas con la neurotoxina 6-hidroxidopamina, (Yang y col., 2011; Tunçel y col., 2012). En cambio, no se conocen efectos directos de VIP en riñón, aunque diferentes ensayos con su homólogo PACAP38 indican un efecto protector frente a un modelo de isquemia/reperfusión renal inducida, con incremento de la expresión de Bcl-2 (Horvath y col., 2010).

Nuestros resultados muestran además que este **efecto renoprotector** de VIP es ejercido directamente por el receptor **FPRL1** y no por  $VPAC_{1/2}$ . Se trata de un novedoso resultado ya que el efecto protector de VIP frente al daño renal inducido por un agente externo se pone de manifiesto que ocurre a través de FPRL1. Un efecto mediado por este receptor a través de VIP se ha descrito también en monocitos humanos, donde el neuropéptido desencadena la activación de PI-3K/ERK a través del receptor FPRL1 de manera independiente de AMPc (El Zein y col., 2008).



La inflamación renal es causa o efecto de la mayoría de las patologías renales agudas y crónicas. Además, el fallo renal agudo es una complicación muy frecuente que se genera tras un proceso infeccioso por bacterias Gram-negativas y su endotoxina, LPS, ha sido utilizada en diferentes modelos de enfermedades renales para provocar inflamación (Zhong y col., 2011). Como se ha mencionado en la Introducción las células del túbulo proximal son sensibles y vulnerables frente a cambios externos, demostrándose en estudios previos que, durante el daño renal, las células epiteliales del túbulo proximal son una diana en muchas patologías, incluyendo sepsis e infecciones renales inducidas por LPS (Zager y col., 2006). El pretratamiento de las células HK2 con VIP y posterior tratamiento con LPS atenúa tanto la expresión de la citoquina IL-6 inducida por LPS, como la activación por fosforilación de STAT3. Es bien conocida la implicación de la vía IL-6/STAT3 en la respuesta inflamatoria, capaz de inhibir la apoptosis en células expuestas a un ambiente tóxico que finalmente desencadene en inflamación (Liu y col., 2010). También, el factor de transcripción NFkB es un mediador de la respuesta inmune e inflamatoria en respuesta a una señal extracelular y tras dicho estímulo se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes diana, entre los que se encuentra IL-6 (Ponce y col., 2009). Por esta razón, analizamos si el efecto de VIP en la disminución de la vía IL-6/STAT3 inducida por LPS, estaba mediada por NFkB. Comprobamos que VIP reduce el incremento de los niveles de p50 nucleares producidos por la endotoxina. Así, queda demostrado que **VIP** es capaz de atenuar la inflamación renal inducida por LPS por **inhibición de los niveles de ARNm de IL-6 y de la proteína STAT3 fosforilada**, además de **inhibir la translocación nuclear de NFkB inducida por endotoxemia**. Datos previos en la literatura con modelos *in vivo* han demostrado efectos protectores de VIP frente a daño pulmonar agudo provocado por un “shock” séptico en ratas inducidas con LPS (Zuo y col., 2010). Además, VIP disminuye la producción de citoquinas inflamatorias, inhibe la proliferación de células T y muestra un efecto protector en modelos de endotoxemia reduciendo la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  (Delgado y col., 1999; Delgado y col., 2004). Un “shock” séptico es la causa más común de

daño renal agudo, y está asociado con una alta tasa de mortalidad pero en la actualidad, no existen fármacos que actúen por si solos y estén aprobados para el tratamiento de fallo renal agudo inducido, por lo que la síntesis de análogos estables de VIP podría ser considerada una buena estrategia para evitarlo (Pickkers y col., 2012).

El propio entorno inflamado, a su vez retroalimenta el sistema, como se observa tras el tratamiento de las células HK2 con LPS incrementándose tanto los niveles citosólicos de VIP como la expresión de los receptores VPAC<sub>1</sub> y FPRL1. Este efecto se acentúa si las células se pretratan con el neuropéptido, encontrando que las dos señales ejercen efectos aditivos. Como se puede observar, **VIP potencia el efecto estimulador de LPS sobre la expresión del sistema VIP/VPAC<sub>1</sub>/FPRL-1**, efecto que podría explicarse como un mecanismo de defensa celular, en el que las células estimulan la producción endógena de VIP para aminorar los efectos que ocasiona el tratamiento con LPS.

La investigación y el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales es uno de los campos que actualmente están más activos en la investigación del CCR, tumor urológico muy agresivo considerado en la actualidad el más letal de las enfermedades urológicas. Este estudio demuestra que **VIP ejerce un efecto antiproliferativo, antiangiogénico y antimetastático en las células A498, mediado por la vía VPAC<sub>1/2</sub>/AMPc/PI3K/↓STAT3/↓NFkB/↑p53/↑ROS**, corroborándose con la demostración de la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*. Además, se demuestra que **VIP ejerce sobre las células epiteliales de túbulo proximal un efecto angiogénico y protector frente al daño por estrés u otros agentes inflamatorios** (Fig. 85). En consecuencia, el análisis global de los resultados permite señalar a VIP como potencial diana terapéutica para reducir el desarrollo del carcinoma de células claras y prevenir otras enfermedades renales de enorme repercusión clínica.

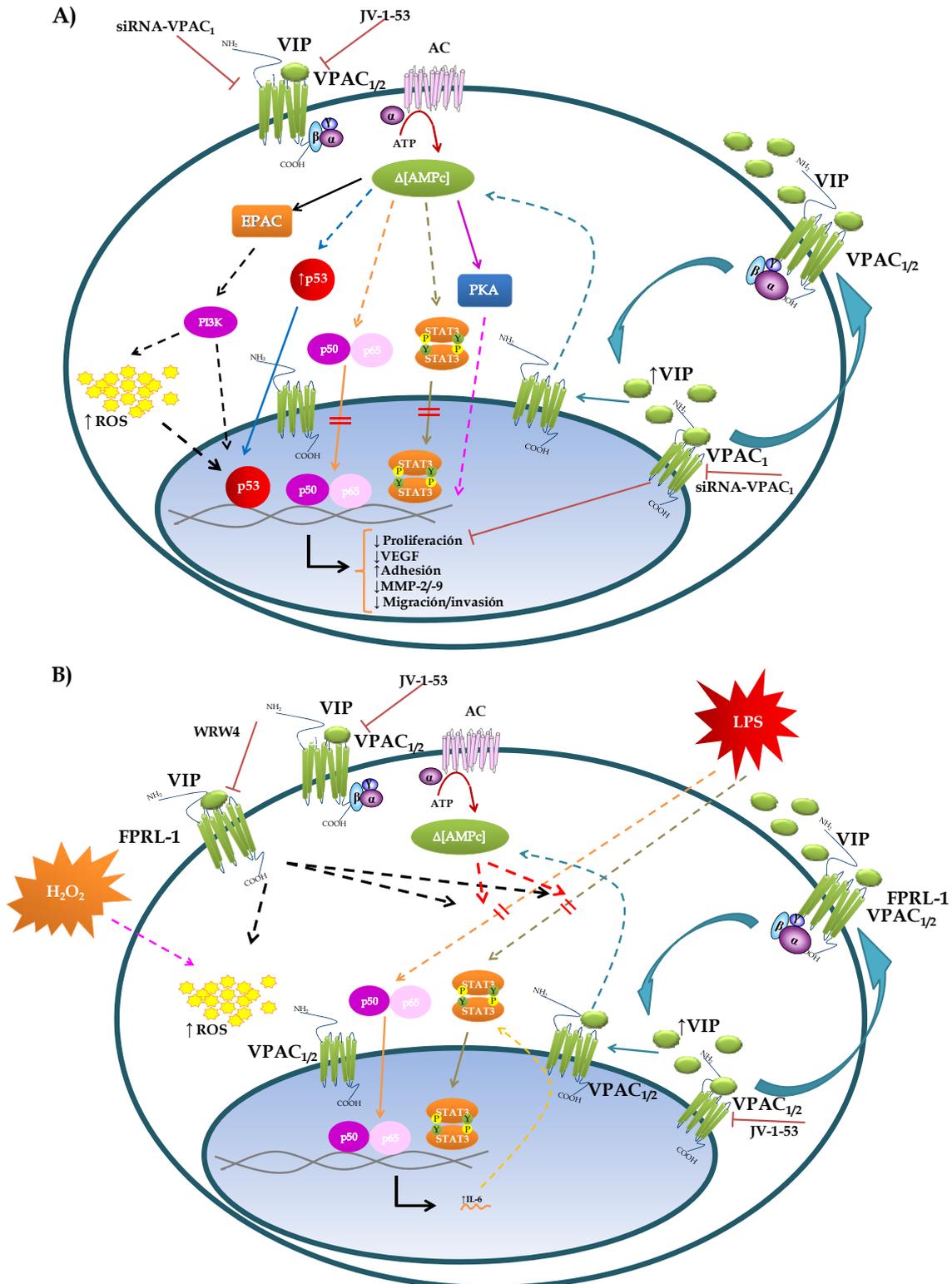


Figura 80: Propuesta de mecanismo de los efectos reguladores de VIP en células tumorales renales (A) y en células epiteliales de túbulo proximal (B).

## **6. Conclusiones**





1. El tejido renal humano expresa niveles detectables de VIP, tanto de su ARNm como del propio neuropéptido. El tejido tumoral de las muestras de pacientes con CCR de células claras tiene niveles de expresión de VIP más bajos que el tejido no tumoral del mismo paciente. VPAC<sub>1</sub> es el receptor mayoritario en las células de túbulo proximal y presenta una localización nuclear en todas las muestras analizadas.
2. La línea celular tumoral A498 expresa niveles citosólicos y de ARNm de VIP más elevados que los observados en células HK2. La expresión y localización de los receptores es heterogénea, VPAC<sub>1</sub> es el receptor mayoritario en ambas líneas celulares, con localización preferentemente nuclear. VPAC<sub>2</sub> se expresa de forma débil en las dos líneas celulares, mientras que el receptor FPRL1 solo se ha detectado en membranas de células HK2.
3. El neuropéptido VIP estimula la enzima adenilato ciclasa en ambas líneas celulares, y regula su propia expresión y secreción, además de la de sus receptores.
4. VIP, a través de los receptores VPAC<sub>1/2</sub>, disminuye en células A498 la activación de factores de transcripción implicados en la progresión tumoral, NFκB y STAT3.
5. VIP provoca una disminución de la proliferación y un incremento de ROS en las células A498 a través de la misma ruta de activación (VPAC<sub>1</sub>/EPAC/PI3K), por lo que este incremento de ROS junto con el incremento de p53 y la disminución de PCNA, se postulan en este trabajo como la causa de la disminución de la proliferación.
6. El neuropéptido VIP se comporta como una molécula proangiogénica en células HK2 y antiangiogénica en células A498, al regular de forma distinta los niveles de VEGF<sub>165</sub>. El efecto antiangiogénico está mediado por la vía de señalización: VPAC<sub>1/2</sub>/PI3K.



7. VIP incrementa la capacidad de adhesión de las células tumorales a una base de colágeno a través de la vía de señalización VPAC<sub>1/2</sub>/EPAC/PI3K. A este efecto contribuye la disminución de los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina nucleares.
8. El neuropéptido VIP disminuye en las células tumorales la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas-2 y -9, además de reducir la capacidad de migración, invasión y metástasis de hueso. A excepción del efecto sobre la MMP-2, se demuestra la implicación de los receptores VPAC<sub>1/2</sub>.
9. VIP, a través de VPAC<sub>1/2</sub>, ejerce un efecto antitumoral disminuyendo el crecimiento de tumores experimentales formados a partir de la inoculación de células A498 en ratones.
10. VIP en células HK2, a través del receptor FPRL1, media la disminución de la apoptosis y de los niveles intracelulares de ROS inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
11. VIP en células HK2, a través de la disminución de la activación de NF $\kappa$ B y STAT3, atenúa la producción de la interleuquina proinflamatoria, IL-6, inducido por endotoxina.
12. El estímulo con LPS en células HK2 aumenta la expresión de VIP citosólico, potenciando además la expresión de los receptores VPAC<sub>1</sub> y FPRL-1.

Como **conclusión global**, en este trabajo se propone al neuropéptido VIP y a sus receptores como agentes antitumorales y antimetastásicos frente al CCR de células claras, y como agente renoprotector contra efectos oxidativos e inflamatorios en células de túbulo proximal.

## **7. Bibliografía**





- Abad C, Martínez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M y Gomariz RP. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003; 124: 961-971.
- Absood A, Hu B, Bassily N y Colletti L. VIP inhibits human HepG2 cell proliferation in vitro. *Regul Pept*. 2008; 146: 285-92.
- Abuelo JG. Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med*. 2007; 357: 797-805.
- Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, Dey S y Sung B. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1171: 59-76.
- Ahren B, Alumets J, Ericsson M, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L, Hakanson R, Hedner P, Loren I, Melander A, Rerup C y Sundler F. VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion. *Nature*. 1980; 287: 343-345.
- Akesson L, Ahren B, Edgren G y Degerman E. VPAC2-R mediates the lipolytic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide in primary rat adipocytes. *Endocrinology*. 2005; 146:744-50.
- Albiges L, Salem M, Rini B y Escudier B. Vascular endothelial growth factor-targeted therapies in advanced renal cell carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011; 25: 813-833.
- Alcolado N, Conrad DJ, Rafferty S, Chappe FG y Chappe VM. VIP-dependent increase in F508del-CFTR membrane localization is mediated by PKC $\epsilon$ . *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011; 301: 53-65.
- Alleaume C, Eychene A, Caigneaux E, Muller JM y Philippe M. Vasoactive intestinal peptide stimulates proliferation in HT29 human colonic adenocarcinoma cells: concomitant activation of Ras/Rap1-B-Raf-ERK signalling pathway. *Neuropeptides*. 2003; 37: 98-104.
- Anglada FJ, Pablo Campos P, Prieto R, Carazo JL, Regueiro JC, Vela F y Requena MJ. Nuevos patrones epidemiológicos y factores de riesgo en cáncer renal. *Actas Urológicas españolas*. 2009; 33: 459-467.



- Ao X, Fang F y Xu F. Vasoactive intestinal peptide protects alveolar epithelial cells against hyperoxia via promoting the activation of STAT3. *Regul Pept.* 2011; 168: 1-4.
- Arimura A, Li M y Batuman B. Potential protective action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP38) on in vitro and in vivo models of myeloma kidney injury. *Blood Jan.* 2006; 107: 661-668.
- Bae YS, Park JC, He R, Ye RD, Kwak JY, Suh PG y Ho Ryu S. Differential signaling of formyl peptide receptor-like 1 by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-CONH<sub>2</sub> or lipoxin A<sub>4</sub> in human neutrophils. *Mol Pharmacol.* 2003; 64: 721-730.
- Bai L, Yang JC, Ok JH, Mack PC, Kung HJ y Evans CP. Simultaneous targeting of src kinase and receptor tyrosine kinase results in synergistic inhibition of renal cell carcinoma proliferation and migration. *Int J Cancer.* 2012; 130: 2693-2702
- Balsa D, Pérez V, Fernández-Alvarez E y Unzeta M. Kinetic behaviour of some acetylenic indolalkylamine derivatives and their corresponding parent amines. *J Neural Transm Suppl.* 1994; 41:281-285.
- Banumathy G y Cairns P. Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2010; 10 (7): 658-664.
- Barbolina MV, Burkhalter RJ y Stack MS. Diverse mechanisms for activation of Wnt signalling in the ovarian tumour microenvironment. *Biochem J.* 2011; 437: 1-12.
- Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiov Reserch.* 2010; 87: 262-271.
- Ben Mkaddem S, Chassin C y Vandewalle A. Contribution of renal tubule epithelial cells in the innate immune response during renal bacterial infections and ischemia-reperfusion injury. *Chang Gung Med J.* 2010; 33: 225-240.
- Bertelsen LS, Barrett KE y Keely SJ. Gs protein-coupled receptor agonists induce transactivation of the epidermal growth factor receptor in T84 cells: implications for epithelial secretory responses. *J Biol Chem.* 2004; 279: 6271-6279.



- Bhargava P y Robinson MO. Development of second-generation VEGFR tyrosine kinase inhibitors: current status. *Curr Oncol Rep.* 2011; 13: 103-111.
- Bkaily G, Choufani S, Hassan G, El-Bizri N, Jacques D y D'Orléans-Juste P. Presence of functional endothelin-1 receptors in nuclear membranes of human aortic vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 36: 414-417.
- Bloom SR, Christofides ND, Delamarter J, Buell G, Kawashima E y Polak JM. Diarrhea in vipoma patients associated with cosecretion of a second active peptide (peptide histidine isoleucine) explained by a single coding gene. *Lancet.* 1983; 2: 1163-5.
- Bollrath J y Greten RF. IKK/NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *European Molecular Biology Organization.* 2009; 10: 1314-1319
- Brady CA y Atterdi LD. P53 at a glance. *J Cell Sci.* 2010; 123: 2527-2532.
- Braun BJ, Slowik A, Leib SL, Lucius R, Varoga D, Wruck CJ, Jansen S, Podschun R, Pufe Ty Brandenburg LO. The formyl peptide receptor like-1 and scavenger receptor MARCO are involved in glial cell activation in bacterial meningitis. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 11
- Brenneman DE y Eiden LE. Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 1159-62.
- Bretheau D, Lechevallier E, de Fromont M, Sault MC, Rampal M y Coulange C. Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. *Cancer.* 1995; 76: 2543-2549.
- Brugarolas J. Biological and molecular basis of RCC. *Clin Transl Oncol.* 2009. 11: 3-9.
- Brum JM, Bove AA, Sufan Q, Reilly W y Go VL. Action and localization of vasoactive intestinal peptide in the coronary circulation: evidence for nonadrenergic, noncholinergic coronary regulation. *J Am Coll Cardiol.* 1986; 7: 406-413.

- Bukowski RM, Fligin RA. y Motzer RJ. Renal cell carcinoma: molecular targets and clinical applications. *Ed. Humana Press*. 2009; Cap.1: 1-12.
- Cáceres W. y Cruz- Chacón A. Renal cell carcinoma: molecularly targeted therapy. *P R Health Sci J*. 2011. 30: 73-77.
- Calam J, Dimaline R, Peart WS, Singh J, y Unwin RJ. Effects of vasoactive intestinal polypeptide on renal function in man. *Journal of Physiology*. 1983; 345: 496-475.
- Casanueva FF, Camiña JP, Carreira MC, Pazos Y, Varga JL y Schally AV. Growth hormone-releasing hormone as an agonist of the ghrelin receptor GHS-R1a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 20452-20457.
- Casibang M, Purdom S, Jakowlew S, Neckers L, Zia F, Ben-Av P, Hla T, You L, Jablons DM y Moody TW. Prostaglandin E2 and vasoactive intestinal peptide increase vascular endothelial cell growth factor mRNAs in lung cancer cells. *Lung Cancer*. 2001; 31: 203- 212.
- Cattaneo F, Guerra G y Ammendola R. Expression and signaling of formyl-peptide receptors in the brain. *Neurochem Res*. 2010; 35: 2018-2026.
- Cattaneo F, Iaccio A, Guerra G, Montagnani S y Ammendola R. NADPH-oxidase-dependent reactive oxygen species mediate EGFR transactivation by FPRL1 in WKYMVm-stimulated human lung cancer cells. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51: 1126-1136.
- Chang HH, Song Z, Wisner L, Tripp T, Gokhale V, Meuillet EJ. Identification of a novel class of anti-inflammatory compounds with anti-tumor activity in colorectal and lung cancers. *Invest New Drugs*. 2011.
- Charlton BG, Neal DE, Simmons NL. 125I-vasoactive intestinal peptide binding in human kidney. *Miner Electrolyte Metab*. 1991; 17: 372-376.
- Cheng X, Ji Z, Tsalkova T y Mei F. Epac y PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008; 40 : 651-662.



- Chew LJ, Murphy D y Carter DA. Alternatively polyadenylated vasoactive intestinal peptide mRNAs are differentially regulated at the level of stability. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 603-613.
- Chibber S, Farhan M, Hassan I y Naseem I. Novel aspect of chemophototherapy in treatment of cancer. *Tumour Biol.* 2012; 33: 701-706
- Cho H, Adami HO y Lindblad P. Epidemiology of renal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* Aug 2011; 25: 651-665.
- Cho NH, Shim HS, Rha SY, Kang SH, Hong SH, Choi YD, Hong SJ y Cho SH. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2003; 44: 560-566.
- Chow W-H, Dong LM y Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 2010; 7: 245-257.
- Chuang MJ, Sun KH, Tang SJ, Deng MW, Wu YH, Sung JS, Cha TL y Sun GH. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2008; 99: 905-913.
- Clark WG, Lipton JM y Said SI. Hyperthermic responses to vasoactive intestinal polypeptide (VIP) injected into the third cerebral ventricle of cats. *Neuropharmacology.* 1978; 17: 883-885.
- Collado B, Carmena MJ, Clemente C, Prieto JC y Bajo AM. Vasoactive intestinal peptide enhances growth and angiogenesis of human experimental prostate cancer in a xenograft model. *Peptides.* 2007; 28: 1896-1901.
- Collado B, Carmena MJ, Sánchez-Chapado M, Ruíz-Villaespesa A, Bajo AM, Fernández-Martínez AB, Varga JL, Schally AV y Prieto JC. Expression of vasoactive intestinal peptide and functional VIP receptors in human prostate cancer: antagonistic action of a growth-hormone-releasing hormone analog. *Int J Oncol.* 2005a; 26: 1629-1635,
- Collado B, Gutiérrez-Cañas I, Rodríguez-Henche N, Prieto JC y Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide increases vascular endothelial growth factor

- expression and neuroendocrine differentiation in human prostate cancer LNCaP cells. *Regul Pept.* 2004; 119: 69-75.
- Collado B, Sánchez MG, Díaz-Laviada I, Prieto JC y Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces c-fos expression in LNCaP prostate cancer cells through a mechanism that involves Ca<sup>2+</sup> signalling. Implications in angiogenesis and neuroendocrine differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 2005b; 1744: 224-233.
  - Colston JT y Freeman GL. Beneficial influence of vasoactive intestinal peptide on ventriculovascular coupling in closed-chest dogs. *Am J Physiol.* 1992; 263: 1300-1305.
  - Corgna E, Betti M, Gatta G, Roila F y De Mulder PHM. Renal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2007; 64: 247-262.
  - Coriat R, Marut W, Leconte M, Ba LB, Vienne A, Chéreau C, Alexandre J, Weill B, Doering M, Jacob C, Nicco C y Batteux F. The organotelluride catalyst LAB027 prevents colon cancer growth in the mice. *Cell Death Dis.* 2011; 2: 191.
  - Couvineau A y Laburthe M. The Family B1 GPCR: Structural Aspects and Interaction with Accessory Proteins. *Curr Drug Targets.* 2012; 13: 103-115.
  - Couvineau A y Laburthe M. VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol.* 2012b; 166: 42-50.
  - Cui WY, Tian AY, Bai T. Protective effects of propofol on endotoxemia-induced acute kidney injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011; 38: 747-754.
  - Cutz E, Chan W, Track NS, Goth A y Said SI. Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators. *Nature.* 1978; 275: 661-662.
  - Dao KK, Teigen K, Kopperud R, Hodneland E, Schwede F, Christensen AE, Martinez A y Døskeland SO. mEpac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J Biol Chem.* 2006. 28; 281: 21500-21511.
  - Davidson A, Moody TW y Gozes I. Regulation of VIP gene expression in general. Human lung cancer cells in particular. *J Mol Neurosci.* 1996; 7: 99-110.



- Dejda A, Jozwiak-Bebenista M y Nowak JZ. PACAP, VIP, and PHI: effects on AC-, PLC-, and PLD-driven signaling systems in the primary glial cell cultures. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1070: 220-225.
- Delahunt B y Thornton A. Renal cell carcinoma. A historical perspective. *J Urol pathol.* 1996; 4: 31-49.
- Delgado M y Ganea D. Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J.* 2003; 17: 944-946.
- Delgado M y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit the MEKK1/MEK4/JNK signaling pathway in LPS-stimulated macrophages. *J Neuroimmunol.* 2000; 110: 97-105.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Gomariz RP y Leceta J. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med.* 2002; 80: 16-24.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J y Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med.* 2001; 7: 563-568.
- Delgado M, Martinez C, Leceta J y Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide in thymus: synthesis, receptors and biological actions. *Neuroimmunomodulation.* 1999; 6: 97-107.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF-kappa B and IFN regulatory factor 1 activation. *J Immunol.* 1999; 162: 4685-4696.
- Delgado M, Pozo D y Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 249-290.
- Delgado M, Pozo D y Ganea D. The significance of vasoactivo intestinal peptide in inmunomodulation. *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 249-290.



- Delgado M, Varela N y González-Rey E. Vasoactive intestinal peptide protects against beta-amyloid-induced neurodegeneration by inhibiting microglia activation at multiple levels. *Glia*. 2008; 56: 1091-1103.
- Dickson L y Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. 2009 *Pharmacol Ther*. 2009; 121: 294-316.
- Dinesh P, Nandita K, Amanjit B, Shrawan KS y Kusum J. Sub-typing of renal cell tumours; contribution of ancillary techniques. *Diagnostic Pathology*. 2009, 4:21.
- Djordjević G, Matusan-Ilijas K, Sinozić E, Damante G, Fabbro D, Grahovac B, Lucin K y Jonjić N. Relationship between vascular endothelial growth factor and nuclear factor-kappaB in renal cell tumors. *Croat Med J*. 2008; 49: 608-617.
- Dockray GJ. Neurochemical basis of reflex relaxation in gastric corpus. *Dig Dis Sci*. 1994; 39: 82-85.
- Dordevic G, Matusan-Ilijas K, Sinozic E, Damante G, Fabbro D, Grahovac B, Lucin K y Jonjic N. Relationship Between Vascular Endothelial Growth Factor and Nuclear Factor- $\kappa$ B in Renal Cell Tumors. *Croat Med J*. 2008; 49: 608-617.
- Dvorakova M, Dhir R, Bastacky SI, Cieply KM, Acquafondata MB, Sherer CR, Mercuri TL, y Parwani AV. Renal oncocytoma: a comparative clinicopathologic study and fluorescent in-situ hybridization analysis of 73 cases with long-term follow-up. *Diagnostic Pathology*. 2010, 5: 32.
- Eble JN. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. *IARC Press, Oxford University Press (distribuidor): Lyon, Oxford*. 2004.
- El Zein N, Badran B y Sariban E. VIP differentially activates beta2 integrins, CR1, and matrix metalloproteinase-9 in human monocytes through cAMP/PKA, EPAC, and PI-3K signaling pathways via VIP receptor type 1 and FPRL1. *J Leukoc Biol*. 2008; 83: 972-981.
- El-Gehani F, Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. Vasoactive intestinal peptide stimulates testosterone production by cultured fetal rat testicular cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 140: 175-178.



- Evans AJ, Russell RC, Roche O, Burry TN, Fish JE, Chow VWK, Yim WY, Saravanan A, Maynard MA, Gervais ML, Sufan RI, Roberts AM, Wilson LA, Betten M, Vandewalle C, Berx G, Marsden PA, Irwin MS, Teh BT, Jewett MAS y Ohh M. VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated reevaluation of SIP1 and Snail. *Mol and Cel Biol.* 2007; 27: 157-169.
- Fahrenkrug J. Gut/brain peptides in the genital tract: VIP and PACAP. *Scand J Clin Lab Invest.* 2001; 234: 35-39.
- Feliciano L y Henning RJ. Vagal nerve stimulation during muscarinic and beta-adrenergic blockade causes significant coronary artery dilation. *J Auton Nerv Syst.* 1998b; 68: 78-88.
- Feliciano L y Henning RJ. Vagal nerve stimulation releases vasoactive intestinal peptide which significantly increases coronary artery blood flow. *Cardiovasc Res.* 1998a; 40: 45-55.
- Fernández-Martínez AB, Arenas Jiménez MI y de Lucio Cazaña FJ. Retinoic acid increases hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  through intracrine prostaglandin E(2) signaling in human renal proximal tubular cells HK-2. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1821: 672-683.
- Fernández-Martínez AB, Arenas Jiménez MI, Hernández IS, García-Bermejo ML, Manzano VM, Fraile EA y de Lucio-Cazaña FJ. Mutual regulation of hypoxic and retinoic acid related signalling in tubular proximal cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011; 43: 1198-1207.
- Fernández-Martínez AB, Bajo AM, Isabel Arenas M, Sánchez-Chapado M, Prieto JC y Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces malignant transformation of the human prostate epithelial cell line RWPE-1. *Cancer Lett.* 2010; 299: 11-21.
- Fernández-Martínez AB, Bajo AM, Sánchez-Chapado M, Prieto JC y Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide behaves as a pro-metastatic factor in human prostate cancer cells. *Prostate.* 2009; 69: 774-786.
- Fernández-Martínez AB, Collado B, Bajo AM, Sánchez-Chapado M, Prieto JC y Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide induces cyclooxygenase-2 expression

- through nuclear factor-kappaB in human prostate cell lines Differential time-dependent responses in cancer progression. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 270: 8-16.
- Frühwald MC, O`Dorisio MS, Cottingham SL, Qualman SJ, O`Dorisio TM. Neuropeptides in developmental tumors of the central and peripheral nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 865: 420-426.
  - Fuhrman SA, Lasky LC y Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982; 6: 655-63.
  - Fujimori N, Oono T, Igarashi H, Ito T, Nakamura T, Uchida M, Coy DH, Jensen RT y Takayanagi R. Vasoactive intestinal peptide reduces oxidative stress in pancreatic acinar cells through the inhibition of NADPH oxidase. *Peptides.* 2011; 32: 2067-2076.
  - Fung JC, Yue GG, Fung KP, Ma X, Yao XQ y Ko WH. Cordyceps militaris extract stimulates Cl<sup>-</sup> secretion across human bronchial epithelia by both Ca<sup>2+</sup> and cAMP-dependent pathways. *J Ethnopharmacol.* 2011; 138: 201-211.
  - Galluzi L, Morselli E, Kepp O, Tajeddina N y Kroemer G. Targeting p53 to mitochondria for cancer therapy. *Cell cycle.* 2008; 7: 1949-1955.
  - Ganea D y Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 229-237.
  - Glowa JR, Panlilio LV, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M y Hill JM. Learning impairment following intracerebral administration of the HIV envelope protein gp120 or a VIP antagonist. *Brain Res.* 1992; 570: 49-53.
  - Gobeil F , Fortier A, Zhu T, Bossolasco M, Leduc M, Grandbois M, Heveker N, Bkaily G, Chemtob S y Barbaz D. G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006; 84: 287-297.
  - Gobeil F Jr, Bernier SG, Vazquez-Tello A, Brault S, Beauchamp MH, Quiniou C, Marrache AM, Checchin D, Sennlaub F, Hou X, Nader M, Bkaily G, Ribeiro-da-Silva A, Goetzl EJ y Chemtob S. Modulation of pro-inflammatory gene expression



- by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1. *J Biol Chem.* 2003; 278: 38875-38883.
- Gobeil F Jr, Zhu T, Brault S, Geha A, Vazquez-Tello A, Fortier A, Barbaz D, Checchin D, Hou X, Nader M, Bkaily G, Gratton JP, Heveker N, Ribeiro-da-Silva A, Peri K, Bard H, Chorvatova A, D'Orléans-Juste P, Goetzl EJ y Chemtob S. Nitric oxide signaling via nuclearized endothelial nitric-oxide synthase modulates expression of the immediate early genes iNOS and mPGES-1. *J Biol Chem.* 2006; 281: 16058-16067.
  - Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J y Delgado M. Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des.* 2001; 7: 89-111.
  - Gomez O y Balsa JA. Autocrine/paracrine action of pituitary vasoactive intestinal peptide on lactotroph hyperplasia induced by estrogen. *Endocrinology.* 2003; 144: 4403-4409.
  - González-Rey E y Delgado M. Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia, and dendritic cells. *Brain Behav Immun.* 2008; 22: 35-41.
  - Gourlet P, Vandermeers A, Van Rampelbergh J, De Neef P, Cnudde J, Waelbroeck M, Robberecht P. Analogues of VIP, helodermin, and PACAP discriminate between rat and human VIP1 and VIP2 receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 865: 247-252.
  - Gozes I, Bodner M, Shwartz H, Shani Y y Fridkin M. Studies toward the biosynthesis of vasoactive intestinal (VIP). *Peptides.* 1984; 5: 161-166.
  - Gozes Y y Furman S. VIP and drug design. *Curr Pharm Des.* 2003; 9: 483-494.
  - Grandoch M, Roscioni SS y Schmidt M. The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *Br J Pharmacol.* 2010; 159:265-284.
  - Granoth R, Fridkin M y Gozes I. VIP and the potent analog, stearyl-Nle(17)-VIP, induce proliferation of keratinocytes. *FEBS Lett.* 2000; 475: 78-83.



- Greene FL y Sobin LH. A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC. *J Surg Oncol*. 2009; 99: 269-272.
- Grivennikov SI y Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NFκB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010; 21:11-19.
- Groneberg DA, Springer J y Fischer A. Vasoactive intestinal polypeptide as mediator of asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2001; 14: 391-401.
- Guan CX, Cui YR, Sun GY, Yu F, Tang CY, Li YC, Liu HJ y Fang X. Role of CREB in vasoactive intestinal peptide-mediated wound healing in human bronchial epithelial cells. *Regul Pept*. 2009; 153: 64-69.
- Guo C, Yang G, Khun K, Kong X, Levy D, Lee P y Melamed J. Activation of Stat3 in renal tumors. *Am J Transl Res*. 2009; 1: 283-290.
- Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W y Aggarwal BB. Upsides and Downsides of ROS for Cancer: The Roles of ROS in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 16: 1295-1322.
- Gutierrez-Cañas I, Juarranz MG, Collado B, Rodríguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *Prostate*. 2005; 63: 44-55.
- Gutiérrez-Cañas I, Rodríguez-Henche N, Bolaños O, Carmena MJ, Prieto JC y Juarranz MG. VIP and PACAP are autocrine factors that protect the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 from apoptosis induced by serum withdrawal. *Br J Pharmacol*. 2003; 139: 1050-1058.
- Hagen BM, Bayguinov O, Sanders KM. VIP and PACAP regulate localized Ca<sup>2+</sup> transients via cAMP-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291: 375-385.
- Haghjoo K, Cash PW, Farid RS, Komisaruk BR, Jordan F y Pochapsky SS. Solution structure of vasoactive intestinal polypeptide (11-28)-NH<sub>2</sub>, a fragment with analgesic properties. *Pept Res*. 1996; 9: 327-331.



- Hahm SH y Eiden LE. Five discrete cis-active domains direct cell type-specific transcription of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene. *J Biol Chem.* 1998; 273: 17086-17094.
- Hahm SH y Eiden LE. Two separate cis-active elements of the vasoactive intestinal peptide gene mediate constitutive and inducible transcription by binding different sets of AP-1 proteins. *J Biol Chem.* 1999; 274: 25588-25593.
- Hamelink C, Hahm SH, Huang H y Eiden LE. A restrictive element 1 (RE-1) in the VIP gene modulates transcription in neuronal and non-neuronal cells in collaboration with an upstream tissue specifier element. *J Neurochem.* 2004; 88: 1091-1101.
- Hammond EC., Smoking in relation to death rates of 1 million men and women. *Natl Cancer Inst. Monograph.* 1966; 19: 127-204.
- Harmar AJ. An essential role for peptidergic signalling in the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol.* 2003; 15: 335-338.
- Hauk V, Calafat M, Larocca L, Fraccaroli L, Grasso E, Ramhorst R y Leirós CP. Vasoactive intestinal peptide/vasoactive intestinal peptide receptor relative expression in salivary glands as one endogenous modulator of acinar cell apoptosis in a murine model of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2011; 166: 309-316.
- Hedlund P, Alm P, Ekstrom P, Fahrenkrug J, Hannibal J, Hedlund H, Larsson B, Andersson KE. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, helospectin, and vasoactive intestinal polypeptide in human corpus cavernosum. *Br J Pharmacol.* 1995; 116: 2258- 2266.
- Heemskerk S, Pickkers P, Bouw MP, Draisma A, van der Hoeven JG, Peters WH, Smits P, Russel FG y Masereeuw R. Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1: 853-862.



- Heinrich EL, Walser TC, Krysan K, Liclican EL, Grant JL, Rodriguez NL y Dubinett SM. The Inflammatory Tumor Microenvironment, Epithelial Mesenchymal Transition and Lung Carcinogenesis. *Cancer Microenviron.* 2011.
- Hejna M, Hamilton G, Brodowicz T, Haberl I, Fiebiger WC, Scheithauer W, Virgolini I, Kostler WJ, Oberhuber G y Raderer M. Serum levels of vasoactive intestinal peptide (VIP) in patients with adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Anticancer Res.* 2001; 21: 1183-1187
- Henning RJ y Sawmiller DR. Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 27-37.
- Hernando L, Aljama P, Arias M, Caramelo C, Egido J y Lamas S. Nefrología clínica. Ed. Panamericana Press. 2008; Cap. 13: 625-655.
- Herrera JL, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Montesinos R, Quintana FJ, Najmanovich R y Pozo D. Toll-like receptor stimulation differentially regulates vasoactive intestinal peptide type 2 receptor in macrophages. *J Cell Mol Med.* 2009; 13: 3209-3217.
- Hewitson LD. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296: 1239-1244.
- Higgins DF, Kimura K, Iwano M y Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell cycle.* 2008; 9: 1128-1132.
- Hill y col, 2010. Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies. *Br J Pharmacol.* 2010; 161: 1266-1275.
- Horinouchi T, Higa T, Aoyagi H, Nishiya T, Terada K y Miwa S. Adenylate cyclase/cAMP/protein kinase A signaling pathway inhibits endothelin type A receptor-operated Ca<sup>2+</sup> entry mediated via transient receptor potential canonical 6 channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 340: 143-151.
- Horvath G, Brubel R, Kovacs K, Reglodi D, Opper B, Ferencz A, Szakaly P, Laszlo E, Hau L, Kiss P, Tamas A y Racz B. Effects of PACAP on oxidative



- stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *J Mol Neurosci.* 2011; 43: 67-75.
- Horvath G, Bruvel R, Kovacs K, Reglodi D, Opper B, Ferencz A, Szakaly P, Laszlo E, Hau L, Kiss P y Racz B. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in primary rat kidney and human hepatocyte cell cultures. *J Mol Neuroscience.* 2011; 43: 67-75.
  - Horvath G, Racz B, Szakaly P, Kiss P, Laszlo E, Hau L, Tamas A, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A y Reglodi D. Mice deficient in neuropeptide PACAP demonstrate increased sensitivity to in vitro kidney hypoxia. *Transplant Proc.* 2010; 42: 2293-2295.
  - Houdeau E, Prudhomme MJ y Rousseau JP. Regional difference in the distribution of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerve fibres along the uterus and between myometrial muscle layers in the rat. *Histochem J.* 1998; 30: 525-529.
  - Itoh N, Obata K, Yanaihara N y Okamoto H. Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature.* 1983; 304: 547-549.
  - Itri J y Colwell CS. Regulation of inhibitory synaptic transmission by vasoactive intestinal peptide (VIP) in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol.* 2003; 90: 1589-1597.
  - Ivanova M, Belcheva S, Belcheva I, Negrev N y Tashev R. Lateralized hippocampal effects of vasoactive intestinal peptide on learning and memory in rats in a model of depression. *Psychopharmacology.* 2011.
  - Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Wnt signaling from membrane to nucleus:  $\beta$ -Catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44: 847-850.
  - Janet M y Torpy MD. Kidney cancer. *Jama patient page.* 2011; 306: 226.
  - Jensen SL, Fahrenkrug J, Holst JJ, Nielsen OV y Schaffalitzky de Muckadell OB. Secretory effects of VIP on isolated perfused porcine pancreas. *Am J Physiol.* 1978; 235: 387-391.



- Ji Ma J, Liu W, Yan X, Wang Q, Zhao Q, Xue Y, Ren H, Wu L, Cheng Y, Li S, Miao L, Yao L y Zhang L. Inhibition of Endothelial Cell Proliferation and Tumor Angiogenesis by Up-Regulating *NDRG2* Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2012; 7: 32368.
- Jiang S, Kopras E, McMichael M, Bell RH Jr y Ulrich CD 2nd. Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates in vitro growth of VIP-1 receptor-bearing human pancreatic adenocarcinoma-derived cells. *Cancer Res*. 1997; 57: 1475-1480.
- Jo SK, Rosner MH, Okusa MD. Pharmacologic treatment of acute kidney injury: why drugs haven't worked and what is on the horizon. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; 2: 356.
- Joerger AC y Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53 and cancer-associated mutants. *Adv Cancer Res*. 2007; 97: 1-23.
- Johnston PA. y Grandis JR. STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Molecular interventions*. 2011; 11: 18-26.
- Johnston y Siderovski, 2007. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol*. 2007; 72: 219-230.
- Jönsson M, Norrgård O y Forsgren S. Epithelial expression of vasoactive intestinal peptide in ulcerative colitis: down-regulation in markedly inflamed colon. *Dig Dis Sci*. 2012; 57: 303-310.
- Juarranz MG, De Neef P y Robberecht P. Vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC(1) subtype is predominant in rat prostate membranes. *Prostate*. 1999; 41: 1-9.
- Juarranz MG, Bolaños O, Gutierrez-Cañas I, Lerner EA, Robberecht P, Carmena MJ, Prieto JC y Rodríguez-Henche N. Neuroendocrine differentiation of the LNCaP prostate cancer cell line maintains the expression and function of VIP and PACAP receptors. *Cell Signal*. 2001; 13: 887-894.
- Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, Santiago B, Carrión M, Pablos JL y Gomariz RP. Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors



- in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 1086-1095.
- Jung JE, Lee HG, Cho IH, Chung DH, Yoon SH, Yang YM, Lee JW, Choi S, Park JW, Ye SK y Chung MH. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J.* 2005; 19: 1296-1298.
  - Khan AM, Li M, Brant E, Maderdrut JL, Majid DS, Simon EE y Batuman V. Renoprotection with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in cyclosporine A-induced nephrotoxicity. *J Investig Med.* 2011; 59: 793-802.
  - Kiaris H, Schally AV, Busto R, Halmos G, Artavanis-Tsakonas S y Varga JL. Expression of a splice variant of the receptor for GHRH in 3T3 fibroblasts activates cell proliferation responses to GHRH analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 196-200.
  - Klein T y Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases *Amino Acids.* 2011; 41: 271-290.
  - Kniaz D, Pahlavan P, Valaitis D y Arruda JAL. High-affinity binding sites for VIP in renal cortical membranes: Possible role of VIP in renal transport. *Kidney Int.* 1991; 39: 266-272
  - Kobilka , 2007. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28: 397-406.
  - Kodali S, Ding W, Huang J, Seiffert K, Wagner JA y Granstein RD. Vasoactive intestinal peptide modulates Langerhans cell immune function. *J Immunol.* 2004; 173: 6082-6088.
  - Koh SW y Waschek JA. Corneal endothelial cell survival in organ cultures under acute oxidative stress: effect of VIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 4085-4092.
  - Koh SW, Chandrasekara K, Abbondandolo CJ, Coll TJ y Rutzen AR. VIP and VIP gene silencing modulation of differentiation marker N-cadherin and cell shape of corneal endothelium in human corneas ex vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49: 3491-8.

- Koh SW, Cheng J, Dodson RM, Ku CY y Abbondandolo CJ. VIP down-regulates the inflammatory potential and promotes survival of dying (neural crest-derived) corneal endothelial cells ex vivo: necrosis to apoptosis switch and up-regulation of Bcl-2 and N-cadherin. *J Neurochem.* 2009; 109: 792-806.
- Koh SW, Cheng J, Dodson RM, Ku CY y Abbondandolo CJ. VIP down-regulates the inflammatory potential and promotes survival of dying (neural crest-derived) corneal endothelial cells ex vivo: necrosis to apoptosis switch and up-regulation of Bcl-2 and N-cadherin. *J Neurochem.* 2009; 109: 792-806.
- Koh SW, Gloria D y Molloy J. Corneal endothelial autocrine VIP enhances its integrity in stored human donor corneoscleral explant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52: 5632-40.
- Koh SW. Corneal endothelial autocrine trophic factor VIP in a mechanism-based strategy to enhance human donor cornea preservation for transplantation. *Exp Eye Res.* 2012; 95: 48-53.
- Laburthe M y Couvineau A. Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regulatory peptides.* 2002; 108: 165-173.
- Laburthe M, Couvineau A y Marie JC. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels.* 2002; 8: 137-153.
- Laburthe M, Couvineau A y Tan V. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides.* 2007; 28: 1631-1639.
- Laitinen LA, Laitinen A, Salonen RO y Widdicombe JG. Vascular actions of airway neuropeptides. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136: 59-64.
- Langer I y Robberecht P. Mutations in the carboxy-terminus of the third intracellular loop of the human recombinant VPAC1 receptor impair VIP-stimulated [Ca<sup>2+</sup>] increase but not adenylate cyclase stimulation. *Cell Signal.* 2005; 17: 17-24.
- Laso FJ. Patología general. Introducción a la medicina clínica. Ed. Masson: Barcelona, España. 2004.



- Latif F, Mubarak M, Kazi JI. Histopathological characteristics of adult renal tumours: a preliminary report. *J Pak Med Assoc.* 2011; 61: 224-228.
- Le XF, Marcelli M, McWatters A, Nan B, Mills GB, O'Brian CA y Bast RC Jr. Heregulin-induced apoptosis is mediated by down-regulation of Bcl-2 and activation of caspase-7 and is potentiated by impairment of protein kinase C alpha activity. *Oncogene.* 2001; 20: 8258-8269.
- Leifert y col, 2005. G-protein-coupled receptors in drug discovery: nanosizing using cell-free technologies and molecular biology approaches. *J Biomol Screen.* 2005; 10: 765-779.
- Lelievre V, Becq-Giraudon L, Meunier AC y Muller JM. Switches in the expression and function of PACAP and VIP receptors during phenotypic interconversion in human neuroblastoma cells. *Neuropeptides.* 1996; 30: 313-322.
- Li GH, Qian W, Song GQ y Hou XH. Effect of vasoactive intestinal peptide on gastric adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22: 1328-1335.
- Li L y Kaelin WG Jr. New insights into the biology of renal cell carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2011; 25: 667-686.
- Li L, She H, Yue S, Feng D y Luo Z. Vasoactive intestinal peptide induces surfactant protein A expression in ATII cells through activation of PKC/c-Fos pathway. *Peptides.* 2010; 31: 2046-2051.
- Li M, Balamuthusamy S, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE y Batuman V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cisplatin-induced renal failure. *J Mol Neurosci.* 2011; 43: 58-66.
- Li M, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE y Batuman V. The effect of PACAP38 on MyD88-mediated signal transduction in ischemia-/hypoxia-induced acute kidney injury. *Am J Nephrol.* 2010; 32: 522-532.
- Li M, Maderdrut JL, Lertora JJ, Arimura A y Batuman V. Renoprotection by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in multiple myeloma and other kidney diseases. *Regul Pept.* 2008; 145: 24-32.

- Li X, Su J, Cui X, Li Y, Barochia A y Eichacker PQ. Can we predict the effects of NF-kappaB inhibition in sepsis? Studies with parthenolide and ethyl pyruvate. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009; 18: 1047-1060.
- Liang C. Negative regulation of autophagy. *Cell Death Differ*. 2010; 17: 1807-1815.
- Linder S, Barkhem T, Norberg A, Persson H, Schalling M, Hökfelt T y Magnusson G. Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 605-609.
- Lineham WM, Pinto PA, Srinivasan R, Merino M, Choyke P, Choyke L, Coleman J, Toro J, Glenn G, Vocke C, Zbar B, Schmidt LS, Bottaro D, Neckers L. Identification of the genes for kidney cancer: opportunity for disease-specific targeted therapeutics. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13: 671-679.
- Liu D, Guo H, Li Y, Xu X, Yang K, y Bai Y. Association between Polymorphisms in the Promoter Regions of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Risk of Cancer Metastasis: A Meta-Analysis. *Plos one*. 2012; 7: 1-10.
- Liu D, Krajniak K, Chun D, Sena M, Casillas R, Lelièvre V, Nguyen T, Bravo D, Colburn S y Waschek JA. VIP gene transcription is regulated by far upstream enhancer and repressor elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 284: 211-218.
- Liu Y, Li P-K, Li C y Lin J. Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells. *J Biol Chem*. 2010; 285: 27429-27439.
- Lundberg P, Bostrom I, Mukohyama H, Bjurholm A, Smans K y Lerner UH. Neuro-hormonal control of bone metabolism: vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mRNA expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules. *Regul Pept*. 1999; 85: 47-58.
- Lundberg P, Lie A, Bjurholm A, Lehenkari PP, Horton MA, Lerner UH, Ransjo M. Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts. *Bone*. 2000; 27: 803-810.



- Luo X, Zeng W, Xu X, Popov S, Davignon I, Wilkie TM, Mumby SM y Muallem S. Alternate coupling of receptors to Gs and Gi in pancreatic and submandibular gland cells. *J Biol Chem.* 1999; 274: 17684-17690.
- Luu TN, Dashwood MR, Chester AH, Tadjkarimi S y Yacoub MH. Action of vasoactive intestinal peptide and distribution of its binding sites in vessels used for coronary artery bypass grafts. *Am J Cardiol.* 1993; 71: 1278-1282.
- Malhotra RK, Wakade TD y Wakade AR. Vasoactive intestinal polypeptide and muscarine mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup> through breakdown of phosphoinositides to induce catecholamine secretion. Role of IP<sub>3</sub> in exocytosis. *J Biol Chem.* 1988; 263: 2123-2126.
- Markman B, Dienstmann R y Tabernero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway – Beyond Rapalogs. *Oncotarget.* 2010; 1: 530-543
- Marrache AM, Gobeil F Jr, Bernier SG, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Choufani S, Bkaily G, Bourdeau A, Sirois MG, Vazquez-Tello A, Fan L, Joyal JS, Filep JG, Varma DR, Ribeiro-Da-Silva A y Chemtob S. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *Immunol.* 2002; 169: 6474-6481.
- Maruno K, Absood A y Said SI. Vasoactive intestinal peptide inhibits human small-cell lung cancer proliferation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 14373-14378.
- McDermott DF. Immunotherapy and targeted therapy combinations in renal cancer. *Curr Clin Pharmacol.* 2011; 6: 207-213.
- Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, Mukai M, y Okada Y. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Lab Invest.* 2011; 91: 1443-1458.
- Milella M y Felici A. Biology of metastatic renal cell carcinoma. *J Cancer.* 2011; 2: 369-373.
- Mirzoeva OK y col. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. *Cancer Res.* 2009; 69: 565-572.

- Moch H, Artibani W, Delahunt B, Ficarra V, Knuechel R, Montorsi F, Patard JJ, Stief CG, Sulser T y Wild PJ. Reassessing the current UICC/AJCC TNM staging for renal cell carcinoma.. *Eur Urol.* 2009; 56: 636-643.
- Montero AJ y Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs.* 2011; 71: 1385-1396.
- Moody TW y Gozes I. Vasoactive intestinal peptide receptors: a molecular target in breast and lung cancer. *Curr Pharm Des.* 2007; 13: 1099-1104.
- Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J y Jensen RT. Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr Pharm Des.* 2003; 9: 495-509.
- Moody TW, Hill JM y Jensen RT. VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides.* 2003; 24: 163-177.
- Moody TW, Zia F, Draoui M, Brenneman DE, Fridkin M, Davidson A y Gozes I. A vasoactive intestinal peptide antagonist inhibits non-small cell lung cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 4345-4349.
- Morais C, Gobe G, Johnson DW, y Healy H. The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2011; 43: 1537-1549.
- Morrison P.J., Donnelly D.E., Atkinson A.B., Maxwell A.P. Advances in the genetics of familial renal cancer. *The Oncologist.* 2010; 15: 532-538.
- Muller JM, Lelievre V, Becq-Giraudon L y Meunier AC. VIP as a cell-growth and differentiation neuromodulator role in neurodevelopment. *Mol Neurobiol.* 1995; 10: 115-134.
- Nagakawa O, Junicho A, Akashi T, Koizumi K, Matsuda T, Fuse H y Saiki I. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulate interleukin-6 production in prostate cancer cells and prostatic epithelial cells. *Oncol Rep.* 2005; 13: 1217-1221.
- Nagakawa O, Murata J, Junicho A, Matsuda T, Fujiuchi Y, Fuse H y Saiki I. Vasoactive intestinal peptide (VIP) enhances the cell motility of androgen receptor-transfected DU-145 prostate cancer cells (DU-145/AR). *Cancer Lett.* 2002; 176: 93-99.



- Nesland JM, Ottestad L, Heikilla R, Holm R, Tveit K y Borresen AL. C-erbB-2 protein and neuroendocrine expression in breast carcinomas. *Anticancer Res.* 1991; 11: 161-167.
- Nishimoto M, Miyakawa H, Wada K y Furuta A. Activation of the VIP/VPAC2 system induces reactive astrocytosis associated with increased expression of glutamate transporters. *Brain Res.* 2011; 1383: 43-53.
- Nowak JZ, Dejda A y Zawilska JB. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) activate protein kinase C in chick cerebral cortex. *Pol J Pharmacol.* 2001; 53: 695-699.
- O'Dorisio MS, Fleshman DJ, Qualman SJ y O'Dorisio TM. Vasoactive intestinal peptide: autocrine growth factor in neuroblastoma. *Regul Pept.* 1992; 37: 213-226.
- O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Cataland S y Balcerzak SP. Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med.* 1980; 96: 666-672.
- Oldham WM, Van Eps N, Preininger AM, Hubbell WL y Hamm HE. Mapping allosteric connections from the receptor to the nucleotide-binding pocket of heterotrimeric G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 7927-7932.
- Oliva D, Nicosia S, Spada A y Giannattasio G. VIP stimulates ACTH release and adenylate cyclase in human ACTH-secreting pituitary adenomas. *Eur J Pharmacol.* 1982; 83: 101-105.
- Olsson C y Holmgren S. The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001; 128: 481-503.
- Ottesen B y Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance. *Am. J Obstet Gynecol.* 1995; 172: 1615-1631.
- Oya M. Renal Cell Carcinoma: Biological Features and Rationale for Molecular-targeted Therapy. *The Keio Journal of Medicine.* 2009; 58: 1-11.



- Pal S, Datta K y Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res.* 2001; 61: 6952-6957.
- Palmer JB, Cuss FM y Barnes PJ. VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways. *J Appl Physiol.* 1986; 61: 1322-1328.
- Pascual D. y Borque A. Epidemiology of kidney cancer. *Advances in urology.* 2008; 782381.
- Passemard S, Sokolowska P, Schwendimann L y Gressens P. VIP-induced neuroprotection of the developing brain. *Curr Pharm Des.* 2011; 17: 1036-1039.
- Percy CJ, Pat BK, Healy H, Johnson D y Gobe G. Phosphorylation of caveolin-1 is anti-apoptotic and promotes cell attachment during oxidative stress of kidney cells. *Pathology.* 2008; 40: 694-701.
- Pérez-García S, Juarranz Y, Carrión M, Gutiérrez-Cañas I, Margioris A, Pablos JL, Tsatsanis C y Gomariz RP. Mapping the CRF-urocortins system in human osteoarthritic and rheumatoid sinovial fibroblats: effect of vasoactive intestinal peptide. *J Cell Physiol.* 2011; 226: 3261-3269.
- Pickkers P, Heemskerk S, Schouten J, Laterre PF, Vincent JL, Beishuizen A, Jorens PG, Spapen H, Bulitta M, Peters WH, Van der Hoeven JG. Alkaline phosphatase for treatment of sepsis-induced acute kidney injury: a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial. *Crit Care.* 2012; 16: 14.
- Pincus DW, DiCicco-Bloom E y Black IB. Trophic mechanisms regulate mitotic neuronal precursors: role of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Brain Res.* 1994; 663: 51-60.
- Pincus DW, DiCicco-Bloom EM y Black IB. Vasoactive intestinal peptide regulation of neuroblast mitosis and survival: role of cAMP. *Brain Res.* 1990; 514: 355-357.
- Pirrotta MT, Bernardeschi P y Fiorentini G. Targeted-therapy in advanced renal cell carcinoma. *Curr Med Chem.* 2011; 18: 1651-1657.



- Plonowski A, Varga JL, Schally AV, Krupa M, Groot K y Halmos G. Inhibition of PC-3 human prostate cancers by analogs of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) endowed with vasoactive intestinal peptide (VIP) antagonistic activity. *Int J Cancer*. 2002; 98: 624-629.
- Posadas EM y Figlin RA. Systemic therapy in renal cell carcinoma: advancing paradigms. *Oncology*. 2012; 26: 290-301.
- Prives C y Gottifredi V. The p21 and PCNA partnership. A new twist for an old plot. *Cell cycle*. 2008; 7: 3840-3846.
- Prives C y Gottifredi V. The p21 and PCNA partnership: a new twist for an old plot. *Cell Cycle*. 2008; 7: 3840-3846.
- Qin X, Sun X, Luo Z, Guan C y Zhang C. Affection of epidermal growth factor on VIP secretion and VIPR expression in airway epithelial cells. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 1999; 24: 99-102.
- Qu F, Liu HJ, Xiang Y, Liu C, Zhu XL y Qin XQ. Activation of CTRF trafficking and gating by vasoactive intestinal peptide in human bronchial epithelial cells. *J Cell Biochem*. 2011; 112: 902-908
- Rafferty S, Alcolado N, Norez C, Chappe F, Pelzer S, Becq F y Chappe V. Rescue of functional F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by vasoactive intestinal peptide in the human nasal epithelial cell line JME/CF15. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 331: 2-13.
- Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S y Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009; 20: 741-752.
- Rameshwar P, Gascon P, Oh HS, Denny TN, Zhu G y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits the proliferation of bone marrow progenitors through the VPAC1 receptor. *Exp Hematol*. 2002; 30: 1001-1009.
- Reed HE, Cutler DJ, Brown TM, Brown J, Coen CW y Piggins HD. Effects of vasoactive intestinal polypeptide on neurones of the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *J Neuroendocrinol*. 2002; 14: 639-646.

- Reglodi D, Peter K, Horvath G, Lubics A, Laszlo E, Tamas A, Racz B y Szakaly P. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney. *Neuropept.* 2012; 46: 61-70.
- Reichlin S. Neuroendocrine significance of vasoactive intestinal polypeptide. *Ann N Y Acad Sci.* 1988; 527: 431-449.
- Rekasi Z, Schally AV, Plonowski A, Czompoly T, Csernus B y Varga JL. Regulation of prostate-specific antigen (PSA) gene expression and release in LNCaP prostate cancer by antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide. *Prostate.* 2001; 48: 188-199.
- Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, Halmos G, Armatis P, Groot K y Czompoly T. Antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide inhibit tumor proliferation by different mechanisms: evidence from in vitro studies on human prostatic and pancreatic cancers. *Endocrinology.* 2000; 141: 2120-2128.
- Reubi JC, Korner M, Waser B, Mazzucchelli L y Guillou L. High expression of peptide receptors as a novel target gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004; 31: 803-810.
- Reubi JC, Laderach U, Waser B, Gebbers JO, Robberecht P y Laissue JA. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res.* 2002; 60: 30105-3112.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM y Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked?. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49: 1603-1616.
- Riou F, Cespuglio R y Jouvet M. Hypnogenic properties of the vasoactive intestinal polypeptide in rats. *C R Seances Acad Sci.* 1981; 293: 679-682.
- Robinson ES, Khankin EV, Choueiri TK, Dhawan MS, Rogers MJ, Karumanchi SA y Humphreys BD. Suppression of the nitric oxide pathway in metastatic renal



- cell carcinoma patients receiving vascular endothelial growth factor-signaling inhibitors. *Hypertension*. 2010; 56:1131-1136.
- Ronkainen H, Kauppila S, Hirvikoski P, y Vaarala MH. Evaluation of myosin VI, E-cadherin and beta-catenin immunostaining in renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010; 29: 2.
  - Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*. 2009; 8: 205–216.
  - Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ y Hauschildt S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol*. 2011; 31: 379-446.
  - Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol*. 2007; 213: 589-602.
  - Ruellan C, Scemama JL, Clerc P, Fagot-Revurat P, Clemente F y Ribet A. VIP regulation of a human pancreatic cancer cell line: Capan-1. *Peptides*. 1986; 7: 267-271.
  - Sabbatini ME, Chen X, Ernst SA y Williams JA. Rap1 activation plays a regulatory role in pancreatic amylase secretion. *J Biol Chem*. 2008; 283: 23884-23894.
  - Sachs A y Wahle E. Poly (A) tail metabolism and function in eucaryotes. *J Biol Chem*. 1993; 268: 22955-22958.
  - Saetrum Opgaard O, Knutsson M, de Vries R, Tom B, Saxena PR y Edvinsson L. Vasoactive intestinal peptide has a direct positive inotropic effect on isolated human myocardial trabeculae. *Clin Sci*. 2001; 101: 637-643.
  - Said SI y Mutt V. Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. *Eur J Biochem*. 1972; 28: 199-204.
  - Said SI y Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*. 1970; 169: 1217-1218.



- Said SI y Mutt V. Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature*. 1970; 225: 863-864.
- Said SI y Rosenberg RN. Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. *Science*. 1976. 192: 907-908.
- Said SI. The discovery of VIP: initially locked for in the lung, isolated from intestine, and identified as a neuropeptide. *Peptides*. 2007; 28: 1620-1621.
- Said SI. Vasoactive intestinal peptide. *J Endocrinol Invest*. 1986; 9: 191-200.
- Said SI. Vasoactive intestinal polypeptide biologic role in health and disease. *Trends Endocrinol Metab*. 1991; 2: 107-112.
- Schreiber A, Theilig F, Schweda F y Höcherl K. Acute endotoxemia in mice induces downregulation of megalin and cubilin in the kidney. *Kidney Int*. 2012. doi: 10.1038/ki.2012.62.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813: 1263-1268.
- Sharma V, Delgado M y Ganea D. VIP protects Th2 cells by downregulating granzyme B expression. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1070: 540-544.
- Shen B, Kwan HY, Ma X, Wong CO, Du J, Huang Y, Yao X. cAMP activates TRPC6 channels via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (PKB)-mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)-ERK1/2 signaling pathway. *J Biol Chem*. 2011; 286: 19439-19445.
- Shen F, Kirmani KZ, Xiao Z, Thirlby BH, Hickey RJ y Malkas LH. Nuclear Protein Isoforms: Implications for Cancer Diagnosis and Therapy. *J Cell Biochem*. 2011; 112: 756-760.
- Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, y Kozlowski JM. The p53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer. *The Journal of Urology*. 2003; 169: 1219-1228.



- Sorg O y Magistretti PJ. Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition. *J Neurosci.* 1992; 12: 4923-4931.
- Sotomayor S, Carmena MJ, Schally AV, Varga JL, Sánchez-Chapado M, Prieto JC y Bajo AM. Transactivation of HER2 by vasoactive intestinal peptide in experimental prostate cancer: Antagonistic action of an analog of growth-hormone-releasing hormone. *Int J Oncol.* 2007; 31: 1223-1230.
- Sourbier C, Valera-Romero V, Giubellino A, Yang Y, Sudarshan S, Neckers L y Lineham WM. Increasing reactive oxygen species as a therapeutic approach to treat hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma. *Cell Cycle.* 2010; 9: 4183-4189.
- Stickle NH, Cheng LS, Watson IR, Alon N, Malkin D, Irwin MS y Ohh M. Expression of p53 in renal carcinoma cells is independent of pVHL. *Mutat Res.* 2005; 578: 23-32.
- Stiuso P, Giuberti G, Lombardi A, Dicitore A, Limongelli V, Carteni M, Abbruzzese A y Caraglia M.  $\gamma$ -Glutamyl 16-diaminopropane derivative of vasoactive intestinal peptide: a potent anti-oxidative agent for human epidermoid cancer cells. *Amino Acids.* 2010; 39: 661-670.
- Strouse JJ, Young SM, Mitchell HD, Ye RD, Prossnitz ER, Sklar LA y Edwards BS. A novel fluorescent cross-reactive formylpeptide receptor/formylpeptide receptor-like 1 hexapeptide ligand. *Cytometry A.* 2009; 75: 264-270.
- Sun S y Halawani ME. Protein kinase-C mediates chicken vasoactive intestinal peptide stimulated prolactin secretion and gene expression in turkey primary pituitary cells. *Gen Comp Endocrinol.* 1995; 99: 289-297.
- Szakaly P, Laszlo E, Kovacs K, Racz B, Horvath G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamas A, Brubel R, Opper B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaki T, Helyes Z y Reglodi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides.* 2011; 45: 113-121.



- Szema AM, Hamidi SA, Koller A y Martin DW. Vasoactive Intestinal Peptide Knockout (VIP KO) Mouse Model of Sulfite-Sensitive Asthma: Up-regulation of Novel Lung Carbonyl Reductase. *BMC Immunol.* 2011; 12: 66.
- Tachibana T, Saito ES, Takahashi H, Saito S, Tomonaga S, Boswell T, Furuse M. Anorexigenic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in the chick brain are mediated by corticotrophin-releasing factor. *Regul Pept.* 2004; 120: 99-105.
- Tan BHL, Ross JA, Kaasa S, Skorpen F, Fearon KCH y European Palliative Care Research Collaborative. Identification of possible genetic polymorphisms involved in cancer cachexia: a systematic review. *J. Genet.* 2011; 90: 165-177.
- Taylor SS, Buechler JA y Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1990; 59: 971-1005.
- Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, Zhao Y, Harris DC y Zheng G. E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 567305.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Rivera-del Valle N y Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10: 1343-1374.
- Tsai JP, Liou JH, Yeh KT, Tai HC, Cheng YW y Chang HR. Intensity of cytosol expression of 8-OHdG in normal renal tubules is associated with the severity of renal fibrosis. *Swiss Medical Weekly.* 2011; 141: 13268.
- Tsukada T, Fink JS, Mandel G y Goodman RH. Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cyclic AMP. *J Biol Chem.* 1987; 262: 8743-8747.
- Tunçel N, Korkmaz OT, Tekin N, Şener E, Akyüz F y Inal M. Antioxidant and anti-apoptotic activity of vasoactive intestinal peptide (VIP) against 6-hydroxy dopamine toxicity in the rat corpus striatum. *J Mol Neurosci.* 2012; 46: 51-57.



- Umemoto N, Kakurai M, Okazaki H, Kiyosawa T, Demitsu T y Nakagawa H. Serum levels of vasoactive intestinal peptide are elevated in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2003; 31: 161-164.
- Unverferth DV, O'Doriso TM, Muir WW 3rd, White J, Miller MM, Hamlin RL y Magorien RD. Effect of vasoactive intestinal polypeptide on the canine cardiovascular system. *J Lab Clin Med.* 1985; 106: 542-550.
- Valdehita A, Bajo AM, Fernández-Martínez AB, Arenas MI, Vacas E, Valenzuela P, Ruíz-Villaespesa A, Prieto JC y Carmena MJ. Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer. *Peptides.* 2010; 31: 2035-2045.
- Valdehita A, Bajo AM, Schally AV, Varga JL, Carmena MJ y Prieto JC. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces transactivation of EGFR and HER2 in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 302: 41-48.
- Valdehita A, Carmena MJ, Bajo AM y Prieto JC. RNA interference-directed silencing of VPAC1 receptor inhibits VIP effects on both EGFR and HER2 transactivation and VEGF secretion in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 348: 241-246.
- Varga JL, Schally AV, Csernus VJ, Zarándi M, Halmos G, Groot K y Rékási Z. Synthesis and biological evaluation of antagonists of growth hormone-releasing hormone with high and protracted in vivo activities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 692-697.
- Vassiliou E, Jiang X, Delgado M y Ganea D. TH2 lymphocytes secrete functional VIP upon antigen stimulation. *Arch Physiol Biochem.* 2001; 109: 365-368.
- Velinov N, Poptodorov G, Gabrovski N, y Gabrovski S. The role of matrixmetalloproteinases in the tumor growth and metastasis. *Khirurgiia.* 2010; 1: 44-49.
- Vijayan E, Samson WK, Said SI y McCann SM. Vasoactive intestinal peptide: evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone, luteinizing

- hormone, and prolactin in conscious ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1979; 104: 53-57.
- Wander SA, Hennessy BT y Slingerland JM. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathways complexity informs therapeutic strategy. *Science in medicine*. 2011; 121: 1231-1241.
  - Wang H, Lafdil F, Kong X y Gao B. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int j Biol Sci*. 2011; 7: 536-550.
  - Wang H, Lafdil F, Kong X y Gao B. Signal transducer and activator of transcription3 in liver diseases: A novel therapeutic target. *Int J Biol Sci*. 2011; 7: 536-550.
  - Widdicombe JG. Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158: 171-175.
  - Wolford JK y Signs SA. Binding of sequence-specific proteins to the 3'-untranslated region of vasoactive intestinal peptide mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 211: 819- 825.
  - Wollman Y, Lilling G, Goldstein MN, Fridkin M y Gozes I. Vasoactive intestinal peptide: a growth promoter in neuroblastoma cells. *Brain Res*. 1993; 624: 339-341.
  - Wright I y Kapoor A. Current systemic management of metastatic renal cell carcinoma - first line and second line therapy. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2011. 5: 211-221.
  - Xie Y, Wolff DW, Lin MF y Tu Y. Vasoactive intestinal peptide transactivates the androgen receptor through a protein kinase A-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway in prostate cancer LNCaP cells. *Mol Pharmacol*. 2007; 72: 73-85.
  - Yang J, Song TB, Zhao ZH, Qiu SD, Hu XD y Chang L. Vasoactive intestinal peptide protects against ischemic brain damage induced by focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2011; 1398: 94-101.
  - Yang J, Zong CH, Zhao CH, Qian YH, Hu XD y Liu Y. Vasoactive intestinal peptide enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009; 29: 619-622.



- Yang K, Lei G, Jackson MF y Macdonald JF. The involvement of PACAP/VIP system in the synaptic transmission in the hippocampus. *J Mol Neurosci.* 2010; 42: 319-326.
- Yu XJ, Ren XH, Xu YH, Chen LM, Zhou CL y Li CY. Vasoactive intestinal peptide induces vascular endothelial growth factor production in human HaCaT keratinocytes via MAPK pathway. *Neuropeptides.* 2010; 44: 407-411.
- Yuan Q, Hong S, Han S, Zeng L, Liu F, Ding G, Kang Y, Mao J, Cai M, Zhu Y y Wang QX. Preconditioning with physiological levels of ethanol protect kidney against ischemia/reperfusion injury by modulating oxidative stress. *PLoS One.* 2011; 6: 25811.
- Zhang F, Shang D, Zhang Y y Tian Y. Interleukin-22 suppresses the growth of A498 renal cell carcinoma cells via regulation of STAT1 pathway. *PLoS One.* 2011; 6: 20382.
- Zhang S, Liu Y, Guo S, Zhang J, Chu X, Jiang C y Zhu D. Vasoactive intestinal polypeptide relaxes isolated rat pulmonary artery rings through two distinct mechanisms. *J Physiol Sci.* 2010; 60: 389-397.
- Zia H, Hida T, Jakowlew S, Birrer M, Gozes Y, Reubi JC, Fridkin M, Gozes I y Moody TW. Breast cancer growth is inhibited by vasoactive intestinal peptide (VIP) hybrid, a synthetic VIP receptor antagonist. *Cancer Res.* 1996; 56: 3486-3489.
- Zuo WQ, Zhang YC, Gong XH y Zhang YM. Effects of vasoactive intestinal peptide on Toll-like receptor (TLR) 2 mRNA and TLR4 mRNA expression on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rat. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2010; 48: 19-23.



## **8. Summary**





Renal cell carcinoma (RCC) arises mainly from renal tubular epithelium. Clear cell subtypes-RCC, the most frequent and lethal malignant tumor of the kidney and the third most common malignancy in the field of urological oncology, sits in proximal tubules. Metastatic RCC, specially the clear cell subtype, is refractory to chemotherapy due to the expression of multidrug resistance transporters in proximal tubules. One approach to control renal cell carcinoma is growth inhibition since the disease is prevented.

Metastasis is a complex process with several steps which are discernable in the cascade of metastasis: loss of cellular adhesion, increased motility and invasiveness, entry and survival in the circulation, exit into new tissue, and eventual colonization at a distant site.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a neuropeptide widely expressed throughout the body; it is a member of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/secretin/glucagon polypeptide family. VIP exerts a wide range of biological effects acting through VPAC, PAC and FPRL-1 receptors. They are Gs-protein coupled heptahelical receptors that lead to the activation of the cAMP signal transduction system and other intracellular pathways. While cAMP signalling has been classically associated with activation of PKA, many effects of VIP do not rely solely upon PKA signalling. Thus, cAMP also directly regulates EPAC, a guanine nucleotide exchange factor (GEF), as crucial mediators of PKA-independent cAMP signalling. Our experiments showed VIP levels and VPAC<sub>1</sub> nuclear expression in renal tissue and cells. VIP dose-dependently stimulated adenylyl ciclase activity in both HK2 and A498 cells. Moreover, VIP expression and secretion increased with exogenous VIP, as it occurred with VPAC<sub>1</sub> expression in both cells lines and FPRL-1 expression in HK2 cells.

We report in the present study the leading role of VIP in reducing metastatic advance, increasing free radicals and decreasing activation of NFkB and STAT3 in human renal cell carcinoma. The decrease in the nuclear

expression of NFkB after incubation with VIP could be considered one of the signalling pathways involved on VIP reduction of the development of metastatic phenotypes.

To further explore the underlying mechanism, we investigated the effect of VIP on major pro-survival transcriptions factors, **NFkB** and **STAT3**. VIP treatment downregulated NFkB and pSTAT3 nuclear expression in A498 cell line. Moreover, we demonstrate the ability of VIP to decrease cell proliferation in A498 cell line which leads to growth of the tumor mass. Interestingly, VIP increased in tumor cells p53 mRNA and protein expression, decreased PCNA expression and increased ROS levels. For this reason, we suggest that the increase in VIP-induced ROS and p53, is PKA-independent and depends on PI3K activation, being involved in undermining the proliferative potential in renal cell carcinoma.

Our results demonstrate that VIP produces an opposite effect on tumor cells than in non-tumor cells. Under normal conditions, VIP stimulates VEGF expression, perhaps due to the high vascularity present in the kidney. Tumor cells resulted in decreased expression of VEGF, thereby making them less irrigated. The decline in angiogenic capacity, along with the decrease in cell adhesion, and the extracellular matrix degradation and migration support that VIP, acting through PKA-independent PI3K activation, is a potential therapeutic agent for tumor treatment. Our results confirm that, after treatment with VIP, cells adhere better to collagen, thus diminishing their ability to get away from the tumor and to metastasize; furthermore the inhibitory effects of VIP on both the degradation of extracellular matrix in cell migration and invasion are noticeable. In addition, our findings with *in vivo* assays demonstrate that VIP inhibited tumor growth, through VPAC<sub>1/2</sub> receptors. Moreover, VPAC<sub>1/2</sub> receptors were involved in the effect of VIP on the main steps of the metastatic cascade.

We demonstrate that VIP exerts in renal epithelial cells an angiogenic effect and protects against damage by stress or other inflammatory agents. VIP,



acting through the FPRL-1 receptor, decreased apoptosis and intracellular ROS levels induced by  $H_2O_2$ ; also, it decreased activation of NFkB and STAT3 to protect HK2 cells from endotoxin-induced septic shock, acting at least partly by attenuating the production of proinflammatory interleukin IL-6. Stimulation with LPS promotes the expression of cytosolic VIP, also regulating the expression of VPAC<sub>1</sub> and FPRL-1 receptors.

The overall analysis of the results allows drawing VIP as a potential therapeutic agent to reduce the development of clear cell carcinoma and prevent renal diseases of enormous clinical impact.



## **9. Artículos publicados**





El resultado de esta tesis doctoral ha permitido la publicación de las siguientes publicaciones internacionales:

- **Vacas Oliva E**, Fernández-Martínez AB, Bajo AB, Sánchez-Chapado M, Schally AV, Prieto JC y Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits human renal cell carcinoma proliferation. *BBA-Mol Cell Res.* 2012. (En revisión).
- **Vacas Oliva E**, Bajo AM, Sánchez-Chapado M, Prieto JC y Carmena MJ. Vasoactive Intestinal Peptide induces oxidative stress and suppresses metastasis potencial of human clear cell renal cell carcinoma. *Mol Cell Endocrinol.* 2012. (Enviado).

El artículo siguiente representa otro trabajo en el que he participado a lo largo de mi formación científica:

- Valdehita A, Bajo AM, Fernández-Martínez AB, Arenas MI, **Vacas Oliva E**, Valenzuela P, Ruíz-Villaespesa A, Prieto JC y Carmena MJ. Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer. *Peptides.* 2010; 31: 2035–2045.



## **10. Financiación**





Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a la financiación de organismos públicos, a través de los proyectos que se detallan a continuación:

- Potencial del VIP y sus receptores como dianas terapéuticas en el cáncer de próstata: papel sobre la tumorigénesis y la invasión y supervivencia celular y efectos de antagonistas. MEC, SAF2007-63794, 148.830 euros. Investigador principal: Juan Carlos Prieto Villapún, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá.
- Efecto del antagonista de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), JMR-132, en la progresión hacia la metástasis ósea del cáncer de próstata. COMUNIDAD DE MADRID/UNIVERSIDAD DE ALCALÁ CCG08-UAH/BIO-3782, 21.093 euros. Investigadora principal: Ana M<sup>a</sup> Bajo Chueca, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá.
- Receptores y vías de señalización del péptido intestinal vasoactivo (VIP) en cáncer renal. Papel potencial como dianas terapéuticas. JUNTA DE COMUNIDADES DE CASTILLA-LA MANCHA CONSEJERIA DE EDUCACION Y CIENCIA PII 1/09-0061-3802. 50.000 euros. Investigadora principal: M<sup>a</sup> José Carmena Sierra, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá.
- Perfil de expresión del VIP y sus receptores en el cáncer de células renales de células claras y su relación con señales angiogénicas. FUNDACION MUTUA MADRILEÑA (MMA), 10.300 euros. Investigador principal: Manuel Sánchez Chapado, Jefe del Servicio de Urología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias.
- Efecto de antagonistas de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) en la progresión del cáncer de próstata. Comunidad de Castilla la Mancha PII 10-0189-3222, 65.000 €. Investigadora principal: Ana María Bajo Chueca, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá.

- Programa de Incentivación de la Incorporación e Intensificación de la Actividad Investigadora (PI3)- Financiación I3. MEC /UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, 19.500 euros. Investigadora principal: Ana María Bajo Chueca, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá.

Durante la realización de esta tesis doctoral he disfrutado de un contrato como personal investigador de tres años de duración, financiado por el proyecto de investigación PII 1/09-0061-3802, y otros 4 meses por el proyecto de investigación PII 10-0189-3222