



**Universidad Central de
Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología**

**EFFECTO DE LA DIPETARUDINA SOBRE EL CRECIMIENTO
TUMORAL Y GENERACIÓN DE METÁSTASIS EN UN
MODELO DE CÁNCER DE MAMA EN RATONES BALB/c**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller **Sandrines Carolina Bruzual Vásquez** como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

Tutor: Dr. Iván D. Bravo T.

Asesor Académico: Dra. María C. Pérez-G.

CARACAS, VENEZUELA

MAYO-2018

ACTA DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE LA Br. SANDRINES CAROLINA BRUZUAL VÁSQUEZ

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Sandrines Carolina Bruzual Vásquez, C.I.: V.- 20.174.384, titulado “Efecto de la dipetarudina sobre el crecimiento tumoral y generación de metástasis en un modelo de cáncer de mama en ratones BALB/c”, para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veinticuatro días del mes de mayo del año 2018, dejando constar que la Prof. María Carolina Pérez actuó como coordinadora del jurado examinador.


Prof. Alexander Laurentin

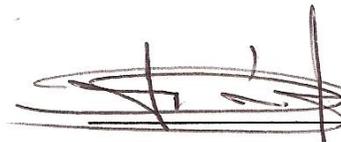
Jurado


Prof. Elizabeth Merentes

Jurado


Prof. María Carolina Pérez

Asesor académico



Dr. Iván D. Bravo T.

Tutor



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que a través de una consulta de fecha 28/05/2018, los miembros del Consejo de la Escuela de Biología acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller. **Bruzual V., Sandrines C.**, titular de la cédula de identidad No. 20.174.384; titulado: **"Efecto de la dipetarudina sobre el crecimiento tumoral y generación de metástasis en un modelo de cáncer de mama en ratones BALB/c."**; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los ocho días del mes de junio del año dos mil dieciocho.


Prof. Fernando González
Director (E)



FG/mb.-

RESUMEN

El cáncer es una patología considerada un grave problema de salud pública a nivel mundial por las altas tasas de morbilidad y mortalidad, con una estimación de incremento de casos de un 70% en los próximos 20 años. El cáncer tiene su origen en las células de las mamas, el cáncer de mama, constituye la principal causa de muerte por cáncer en la mujer. En este tipo de cáncer, la mayoría de los casos de fallecimientos se deben al alto grado de desarrollo de metástasis y no al tumor primario. Por otro lado, ha sido demostrada la asociación de trastornos de la coagulación y de la hemostasia en los cuales participa la trombina, en la progresión tumoral y generación de metástasis. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la dipetarudina, un inhibidor altamente específico de la trombina, sobre la progresión del crecimiento tumoral y la generación de metástasis en un modelo de cáncer de mama producido por células 4T1 derivadas de carcinoma mamario murino, un modelo altamente metastásico, que asemeja el cáncer de mama en humanos y permite reproducir la evolución de la enfermedad. Asimismo, se estudió el efecto de esta droga sobre los parámetros de la coagulación: formación de complejos trombina anti-trombina (TAT) y niveles de fibrinógeno, así como el efecto sobre los niveles de albúmina modificada por isquemia (IMA). En este trabajo se reporta la primera evidencia de actividad anti-tumoral de dipetarudina y reducción del patrón metastásico en el modelo 4T1 y se demuestra que el bloqueo de la actividad de trombina con dipetarudina disminuye el estado de hipercoagulabilidad. Se plantea el uso de dipetarudina como potencial agente terapéutico en la reducción del crecimiento tumoral y del comportamiento invasivo del cáncer de mama.

Palabras clave: Cáncer de mama, células 4T1, coagulación, hipercoagulabilidad, dipetarudina, inhibidores de trombina, trombina.

*A la memoria de mi querido tío Oscar,
quien en vida también fue orgulloso Ucevista.*

“Tarda en llegar y al final hay recompensa”

-Gustavo Cerati, *Zona de promesas*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis amados padres, Sandra y Freddy, por su lucha incansable, por su apoyo incondicional y su amor infinito hacia mí. A mi hermanito Oscar, también por su admiración, apoyo y amor. También agradezco a mis abuelitos Fela y Cucho por su cariño y apoyo, a pesar de la distancia.

A la Ilustre Universidad Central de Venezuela, a la Facultad de Ciencias, por mi formación académica que considero única y por brindarme tantas herramientas para enfrentar y entender la vida. A cada uno de los profesores que inspiraron y sembraron en mí la pasión por la labor científica y el conocimiento.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por ser el lugar maravilloso donde logré llevar a cabo este proyecto. Al Centro de Estudios Avanzados del IVIC, por el apoyo brindado a través de la categoría de Estudiante Tesista de Pregrado. A mi tutor, el Dr. Iván Bravo, por su dedicación, compromiso y paciencia y por fomentar en mí la excelencia. A la Dra. Mercedes López por la facilitación de la droga dipetarudina. Al Dr. Peter Taylor por la donación de las células 4T1. A la Lic. Yolyver Higuerey por su apoyo y asesoría en el cultivo de células 4T1. A la profesora María Carolina Pérez y a mis jurados, la profesora Elizabeth Merentes y el profesor Alexander Laurentin por toda su atención y sugerencias. A mis amigas del IVIC, Patricia, Angelymar y Wilmary, por su apoyo en todos los sentidos.

A mi mejor amiga Vanessa y a su mamá, Mirellita, por su valiosa y excepcional amistad de tantos años, por todo el cariño y apoyo para ayudarme a cumplir mi meta, que más que meta, es un sueño.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo fue llevado a cabo en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, específicamente en el Centro de Biofísica y Bioquímica, Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES.....	21
OBJETIVOS.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Animales.....	29
Modelo tumoral.....	29
Cultivo de células	30
Inoculación de células tumorales.....	30
Evaluación del crecimiento del tumor.....	30
Tratamiento	31
Toma de muestras de sangre.....	32
Necropsia (autopsia) y obtención de tumor y órganos	33
Determinación de complejos trombina-antitrombina (TAT)	33

Determinación de niveles de fibrinógeno.....	34
Determinación de albúmina modificada por isquemia (IMA).....	35
Análisis de los datos	36
RESULTADOS	37
Efecto de la administración de dipetarudina sobre el peso corporal de ratones BALB/c	37
Efecto del tratamiento con dipetarudina sobre la mortalidad de ratones BALB/c con cáncer de mama.....	38
Características morfológicas evolutivas del carcinoma mamario murino	38
Efecto del tratamiento con dipetarudina sobre la necrosis tumoral	39
El tratamiento con dipetarudina disminuye el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	40
Efecto de la administración de dipetarudina en la generación de metástasis	42
Efecto de la dipetarudina sobre la invasión y metástasis en ganglios linfáticos.....	44
Efecto del tratamiento con dipetarudina sobre el peso de los tumores y órganos	46
Efecto de la administración de dipetarudina en la concentración de complejos TAT en ratones con cáncer de mama.....	47
Efecto de la dipetarudina sobre la concentración de fibrinógeno	48
Efecto de la administración de dipetarudina sobre los niveles de albúmina modificada por isquemia (IMA)	49
DISCUSIÓN	51
Evaluación del tratamiento con dipetarudina en un modelo de cáncer de mama de células 4T1.	51

Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> de la dipetardina sobre la progresión tumoral y la generación de metástasis	53
Efecto de la dipetardina sobre la formación de complejos trombina-antitrombina	57
Efecto de la dipetardina sobre los niveles de fibrinógeno	57
Efecto de la dipetardina sobre las modificaciones producidas por isquemia en la unión de albúmina a cobalto exógeno	58
CONCLUSIONES.....	62
RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXOS.....	81
Carta de aprobación de Bioética	81

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ETAPAS EVOLUTIVAS DE LA FORMACIÓN TUMORAL.	39
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. EL PROCESO METASTÁSICO..	5
FIGURA 2. INTERACCIONES TUMOR-SISTEMA HEMOSTÁTICO.....	12
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA TROMBINA.....	13
FIGURA 4. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROTEASAS (PAR)	14
FIGURA 5. MEDICIÓN DEL TUMOR	31
FIGURA 6. INYECCIÓN VÍA INTRAPERITONEAL.....	32
FIGURA 7. EXTRACCIÓN DE SANGRE POR PUNCIÓN CARDÍACA	33
FIGURA 8. CURVA DE ESTÁNDARES DE FIBRINÓGENO..	35
FIGURA 9. VARIACIÓN DEL PESO CORPORAL DE RATONES BALB/C CON CÁNCER DE MAMA	37
FIGURA 10. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE RATONES BALB/C CON CÁNCER DE MAMA..	38
FIGURA 11. ETAPAS EVOLUTIVAS DEL TUMOR PRIMARIO DE CÉLULAS 4T1 EN RATONES BALB/C..39	
FIGURA 12. DESARROLLO DE NECROSIS TUMORAL EN RATONES BALB/C.....	40
FIGURA 13. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DIPETARUDINA SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL IN VIVO EN RATONES BALB/C.	41
FIGURA 14. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIPETARUDINA EN EL CRECIMIENTO TUMORAL IN VIVO EN RATONES BALB/C..	41
FIGURA 15. VOLUMEN DEL TUMOR MAMARIO EXTIRPADO DE RATONES BALB/C.....	42

FIGURA 16. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS METÁSTASIS EN ÓRGANOS DE RATONES BALB/C CON CÁNCER DE MAMA.....	43
FIGURA 17. NÚMERO DE METÁSTASIS EN ÓRGANOS DE RATONES BALB/C CON CÁNCER DE MAMA.	44
FIGURA 18. PRESENCIA DE GANGLIOS EN RATONES BALB/C.....	45
FIGURA 19. PRESENCIA DE GANGLIOS LINFÁTICOS EN RATONES BALB/C CON CÁNCER DE MAMA..	46
FIGURA 20. PESO DE TUMORES Y ÓRGANOS EXTIRPADOS DE RATONES BALB/C CON CÁNCER DE MAMA.	47
FIGURA 21. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DIPETARUDINA EN LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS TAT EN EL PLASMA DE RATONES BALB/C CON CÁNCER DE MAMA.	48
FIGURA 22. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIPETARUDINA EN LA CONCENTRACIÓN DE FIBRINÓGENO EN EL PLASMA DE RATONES BALB/C CON CÁNCER DE MAMA.....	49
FIGURA 23. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIPETARUDINA SOBRE LOS NIVELES DE ALBÚMINA MODIFICADA POR ISQUEMIA (IMA) EN EL SUERO DE RATONES BALB/C CON CÁNCER DE MAMA...	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ABE 1: (del inglés anion binding exosite 1). Exosito 1 de la trombina de unión a aniones

AT: Antitrombina

FT: Factor Tisular

FVIIa: Factor VII de la coagulación activado

i.p.: intraperitoneal

IMA: (del inglés Ischemia Modified Albumin). Albúmina modificada por isquemia

K_i : (del inglés inhibition constant). Constante de inhibición

MEC: Matriz extracelular

PAR: (del inglés Protease-Activated Receptor). Receptor activado por proteasas

PBS: (del inglés Phosphate-Buffered Saline). Buffer fosfato salino.

PC: Procoagulante del cáncer

TAT: Complejo trombina-antitrombina

TEV: Tromboembolismo venoso

INTRODUCCIÓN

El cáncer es considerado un grave problema de salud pública por ser una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, con aproximadamente 14 millones de nuevos casos reportados en 2012 (Burstein y col., 2017). Ocupa el segundo lugar entre las diversas causas de muerte con 8,8 millones de fallecimientos en el año 2015, alrededor de 1 de cada 6 muertes se debe a esta enfermedad y se estima que el número de nuevos casos aumente en un 70% en los próximos 20 años (WHO, 2018). En Venezuela, según los datos del último Anuario de Mortalidad publicado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) el cáncer es la segunda causa de mortalidad en la población (MPPS, 2013).

Por otro lado, el cáncer representa un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por crecimiento y división celular descontrolada que conduce a la formación de tumores malignos, así como por la invasión y propagación de células desde el lugar de origen hacia tejidos adyacentes y órganos distantes (Mitchell, 2016). Además, se considera que es el resultado de la acumulación de mutaciones en genes que regulan el crecimiento, la diferenciación celular y la apoptosis o los que mantienen la integridad genómica (Rubin y Reisner, 2009). Estas mutaciones pueden ser heredadas, inducidas por factores ambientales o resultado de errores en la replicación del ADN (Tomasetti y col., 2017).

Se ha propuesto que, el cáncer puede ser definido por ocho características biológicas que adquieren y caracterizan a las células cancerosas, tales como sostenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los supresores de crecimiento y de la respuesta inmunitaria, resistencia a la muerte celular, mantenimiento del potencial replicativo, inducción de angiogénesis, activación de mecanismos de invasión y metástasis y reprogramación del metabolismo energético (Hanahan

y Weinberg, 2011). Todas estas características favorecen el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis (Wang y col., 2014).

En este sentido, una de las principales características de los tumores malignos es su alta tasa de generación de metástasis, la cual consiste en un complejo y altamente selectivo proceso que involucra varias etapas que conforman la denominada “cascada metastásica”, que inicia con la migración y diseminación de las células desde el tumor primario, que luego intravasan a los sistemas circulatorio y linfático, evadiendo la respuesta inmunitaria, para luego extravasar los lechos capilares distantes y finalmente invadir y proliferar en órganos anatómicamente distantes (Figura 1) (Seyfried y Huysentruyt, 2013).

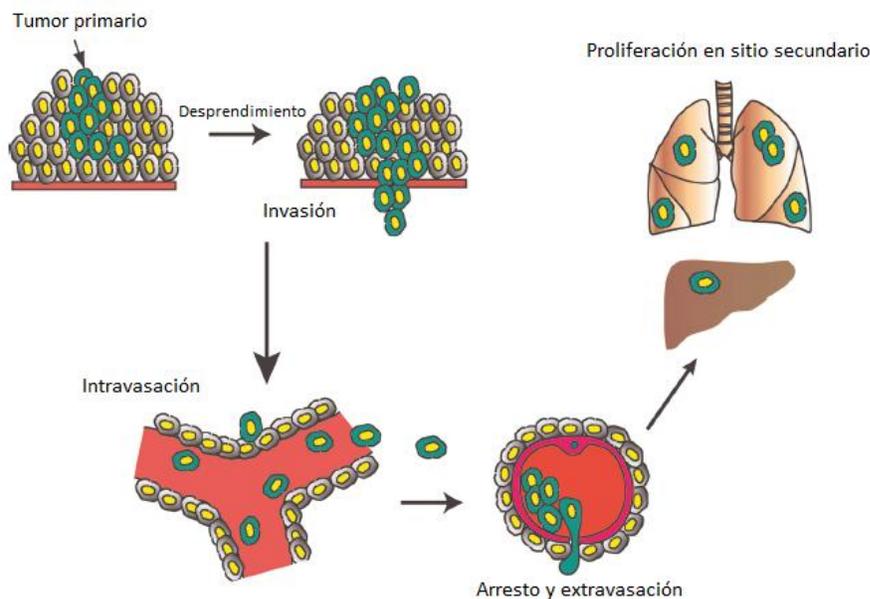


Figura 1. El proceso metastásico. Los pasos iniciales de la metástasis involucran proliferación de las células del tumor primario e invasión hacia tejidos adyacentes y membranas basales. Este proceso continúa hasta que el tumor invade los vasos sanguíneos o linfáticos, las células tumorales individuales se separan del tumor primario y son transportadas a través de la sangre o la linfa a un órgano distante. Posteriormente, las células tumorales se detienen en pequeños vasos dentro del órgano distante, extravasan en el tejido circundante y proliferan en el sitio secundario. Todos estos pasos se deben ejecutar mientras las células tumorales evitan y sobreviven a las señales apoptóticas y a la respuesta inmunitaria del huésped (Tomada y modificada de Hunter y col., 2008).

Por otra parte, las células metastásicas establecen un microambiente que favorece la angiogénesis y la proliferación, lo que resulta en la formación de tumores secundarios (Seyfried y Shelton, 2010). Por lo que, la metástasis es considerada la principal causa de morbilidad y mortalidad en cáncer, ya que genera aproximadamente el 90% de las muertes por esta enfermedad (Seyfried y Huysentruyt, 2013).

Dada la complejidad y heterogeneidad del cáncer, se han descrito diferentes tipos de esta enfermedad, los cuales pueden ser agrupados según su ubicación en el cuerpo, tipo de órgano o el tipo de tejido (tipo histológico) de origen. Considerando este último aspecto, el cáncer puede clasificarse en cinco categorías básicas: carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia y linfoma. Particularmente, los carcinomas tienen su origen en tejidos epiteliales y por lo general afectan órganos que producen secreciones, tales como los pulmones y las mamas (National Cancer Institute, 2018).

En el caso de los carcinomas que inician en las células epiteliales de las mamas, estos producen una enfermedad heterogénea en cuanto a su desarrollo y progresión (Polyak, 2011). Actualmente, el cáncer de mama es considerado el tipo de cáncer diagnosticado con más frecuencia en mujeres a nivel mundial, además, es la principal causa de muerte por cáncer en la mujer, ya que genera alrededor del 15% de todas las muertes por cáncer (Ng y col., 2017). En Venezuela, el cáncer de mama constituye la primera causa de muerte por cáncer en la mujer (Fernández y Reigosa, 2015).

Desde el punto de vista anatómico, las mamas son glándulas compuestas por lóbulos y conductos; por lo que el cáncer de mama puede tener origen en cualquiera de las diferentes regiones que la conforman. En este sentido, el tipo de cáncer que se inicia en los lóbulos se denomina carcinoma lobulillar mientras que el carcinoma ductal es aquel que se inicia en las

células de los conductos y es el tipo más común de cáncer de mama (Instituto Nacional del Cáncer, 2017).

Tomando en cuenta los diferentes sitios de origen del cáncer de mama, se puede clasificar de acuerdo con el potencial de invasión en dos grandes categorías, invasivo (infiltrativo) o no invasivo (*in situ*). En el tipo invasivo, las células cancerosas que se encuentran en los lóbulos o en los conductos pueden propagarse hacia el tejido mamario circundante y extenderse hacia otras partes del cuerpo a través del sistema circulatorio o de los ganglios linfáticos, este tipo de cáncer es el más frecuente en las mujeres. Mientras que, en el cáncer de mama de tipo no invasivo, las células cancerosas solo se delimitan al lóbulo o los conductos donde se originó (Akram y col., 2017).

Con relación a las causas del cáncer de mama, éstas no son muy bien conocidas (Thomson y col., 2014). Sin embargo, han sido asociados numerosos factores de riesgo con el desarrollo y la progresión de esta enfermedad. Dentro de estos factores destacan el inicio temprano de la menopausia, consumo de alcohol y tabaco, exposición a radiación, obesidad, sedentarismo, dieta rica en grasas, envejecimiento (Mehrgou y Akouchekian, 2016), exposición a estrógenos (Akram y col., 2017), factores genéticos, historia familiar, entre otros (Thomson y col., 2014).

Conocer qué tanto se ha extendido el cáncer en el organismo permite determinar las probabilidades de sobrevida y elegir el tratamiento más adecuado. El proceso a través del cual se determina la etapa o estadio de la enfermedad es denominado estadificación. Existen diferentes sistemas de estadificación. En el sistema numérico cada etapa es representada en números romanos (0-IV), donde el estadio 0 es un tipo de cáncer no invasivo y el estadio IV es un tipo de cáncer más avanzado (etapa metastásica). En adición, en esta etapa el cáncer ya se ha propagado

hacia otros órganos, tales como los pulmones, ganglios linfáticos distantes, huesos, hígado y cerebro. Otro sistema de estadificación ampliamente usado es el TNM (por sus siglas en inglés), el cual se basa en 3 características para determinar la etapa de la enfermedad (T: tamaño del tumor, N: presencia en ganglios linfáticos, M: aparición de metástasis) (Donepudi y col., 2014).

El cáncer de mama puede iniciar como una enfermedad local, pero puede metastizar los ganglios linfáticos y órganos distantes. En este tipo de cáncer, la mayoría de los casos de fallecimientos se deben al alto grado de desarrollo de metástasis distantes y no al tumor primario (Chen y col., 2017). La metástasis en el cáncer de mama es un proceso de gran complejidad, ya que involucra múltiples factores y rutas, por lo que, la ampliación del conocimiento de los mecanismos moleculares del proceso metastásico puede contribuir al mejoramiento del manejo clínico de la enfermedad (Scully y col., 2012).

En muchos tipos de carcinoma la ruta metastásica más común consiste en la diseminación de células tumorales a través del drenaje linfático y su posterior acumulación en los ganglios linfáticos regionales. La disección y el examen histopatológico de estos ganglios a fin de hallar células cancerosas alojadas en su interior es el procedimiento estándar para la detección de metástasis (Rahman y Mohammed, 2015). Por otra parte, a pesar de que los avances en el tratamiento del cáncer de mama metastásico han contribuido de manera significativa a incrementar la supervivencia de las pacientes, esta enfermedad aún es considerada la enfermedad maligna más común (Scully y col., 2012).

Los estudios para comprender las etapas de la metástasis han sido desarrollados en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* que incluyen animales tales como la mosca de la fruta, pez cebra, ratas, ratones, conejos, entre otros. Sin embargo, el modelo más utilizado ha sido el ratón de laboratorio (*Mus musculus*), debido a que funciona como un buen sistema para simular las

características fisiopatológicas del cáncer humano. Algunas de las características que hacen de este animal un modelo adecuado para el estudio de la patogénesis del cáncer humano incluyen las similitudes anatómicas, genéticas y fisiológicas que comparten con los humanos, su pequeño tamaño, la facilidad de crianza y mantenimiento y su corto tiempo de gestación (Saxena y Christofori, 2013).

De igual manera, diferentes líneas celulares de origen humano y murino han sido utilizadas en sistemas de cultivo celular para el estudio del cáncer de mama, entre las que se encuentran las líneas 67NR, 4T07, ZR75B, SKBR3, MDA-MB-231, Hs578T, MCF-7 y 4T1 (Jin y col., 2010). La línea celular 4T1 de carcinoma mamario derivado de ratón BALB/c es altamente tumorigénica e invasiva y es uno de los modelos más empleados en el estudio de la metástasis de cáncer de mama (Saxena y Christofori, 2013), esto debido a que el tumor primario crece en el sitio anatómicamente correcto, además la enfermedad metastásica se desarrolla de manera espontánea desde el tumor primario y se disemina por vía hematogéna al hígado, pulmones, huesos y cerebro tal como ocurre en el cáncer de mama humano; y finalmente, su progresión es bastante similar a lo observado en la etapa IV del cáncer de mama humano (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000; Mi y col., 2004).

Con respecto a las diferentes disfunciones que presentan los pacientes con cáncer, se han descrito varios tipos de trastornos de la hemostasia que contribuyen significativamente con el incremento de la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad (Falanga y col., 2017). La hemostasia es el proceso que permite mantener la integridad del sistema circulatorio ante un daño vascular. Para facilitar su estudio, la hemostasia se divide en primaria y secundaria. La hemostasia primaria comprende los mecanismos que permiten la formación del tapón plaquetario en el sitio de la lesión a fin de evitar la pérdida de sangre. Posterior a la formación del tapón

hemostático primario, ocurre la hemostasia secundaria, que involucra la activación del sistema de coagulación con el objetivo de formar fibrina para la estabilización del coágulo. Una vez reparado el daño vascular, la cascada de fibrinólisis es activada a fin de degradar el coágulo formado (Flores-Rivera y col., 2014). Los mecanismos de la cascada de coagulación son activados por el complejo formado entre el factor tisular (FT) y el factor VII activado (FVIIa) (Mackman, 2009; Butenas, 2012). Ante una lesión vascular, el FT, una proteína transmembrana expresada constitutivamente por células asociadas a la pared vascular que incluyen células del músculo liso vascular, fibroblastos adventicios y pericitos, se une al FVIIa, una proteína que circula en el plasma (Butenas, 2012). Este complejo activa los zimógenos FIX y FX a FIXa y FXa respectivamente, dicha activación conduce a la formación de bajas cantidades de trombina, la cual activa los cofactores FV y FVIII. La unión de los factores Va y Xa, denominado complejo protrombinasa (FVa:FXa) cataliza la activación de la protrombina a trombina, que es la proteasa central de la cascada de coagulación. La trombina escinde el fibrinógeno en monómeros de fibrina soluble que polimerizan y además activa el factor XIII a FXIIIa, que a su vez cataliza la reacción de entrecruzamiento de los monómeros de fibrina para formar una matriz insoluble que estabiliza el coágulo (Mackman, 2009; Butenas, 2012).

La formación del coágulo y su posterior remoción son respuestas fisiológicas primarias ante una lesión vascular; sin embargo, el desequilibrio originado por aumento de la actividad de los factores protrombóticos o disminución de la actividad de los factores antitrombóticos puede conducir a un estado protrombótico, también conocido como “estado de hipercoagulabilidad” (Matijevic y Wu, 2006). La hipercoagulabilidad es definida como la tendencia excesiva hacia la coagulación sanguínea que puede incrementar el riesgo de trombosis, la cual consiste en la formación de coágulos que causan obstrucción del flujo sanguíneo (Kell y Pretorius, 2015).

Por otro lado, se conoce que existe una estrecha relación entre el cáncer, la aparición de trastornos de la coagulación y la trombosis. Esta relación se fundamenta en el hecho de que el cáncer induce un cambio protrombótico del sistema hemostático del individuo, que genera la activación de la cascada de coagulación y estimula las propiedades procoagulantes de las células tumorales que son fundamentales para la diseminación tumoral y la generación de metástasis (Falanga y col., 2017).

La asociación entre trombosis y cáncer fue reconocida por primera vez a principios del siglo XIX por de Bouillaud y descrita más exhaustivamente en el año 1865 por Armand Trousseau (Franchini y Mannucci, 2012; Falanga y col., 2013) quien evidenció que los pacientes que presentaban tromboembolismo venoso idiopático (TEV) eran con frecuencia portadores de un cáncer oculto. Además de esto, el Profesor Trousseau también observó que los pacientes diagnosticados con cáncer tenían una mayor tendencia a desarrollar TEV (Rickles y col., 2003). Además, existe evidencia acumulada que apoya esta asociación, y que ha demostrado que entre el 4 y 12% de los pacientes diagnosticados con cáncer, presentan concomitantemente el diagnóstico de tromboembolismo venoso (TEV) (Franchini y Mannucci, 2012). De igual manera, la asociación entre cáncer y el estado de hipercoagulabilidad se observa inclusive en pacientes sin trombosis evidente. En estos individuos se observan valores alterados de la coagulación en pruebas de laboratorio, caracterizados por distintos grados de activación de la cascada de coagulación (Caine y col., 2002; Falanga y col., 2017).

Los mecanismos fisiopatológicos que conllevan a la activación de la cascada de coagulación en pacientes con cáncer son complejos e involucran múltiples factores. No obstante, se atribuye un papel importante a la expresión de propiedades procoagulantes asociadas a las células tumorales. Estas células activan el sistema hemostático mediante la expresión de

proteínas procoagulantes, exposición de lípidos procoagulantes, liberación de citocinas inflamatorias y micropartículas, y mecanismos de adhesión a las células vasculares del huésped (Figura 2) (Falanga y col., 2013). De las proteínas procoagulantes, el factor tisular (FT) es la mejor caracterizada (Falanga y col., 2017). Es una glicoproteína transmembrana de 47 kDa que se une al factor VIIa formando un complejo que inicia la cascada de coagulación (Caine y col., 2002) y, a diferencia de las células normales, es expresada constitutivamente en la superficie de las células tumorales (Caine y col., 2002; Falanga y col., 2017).

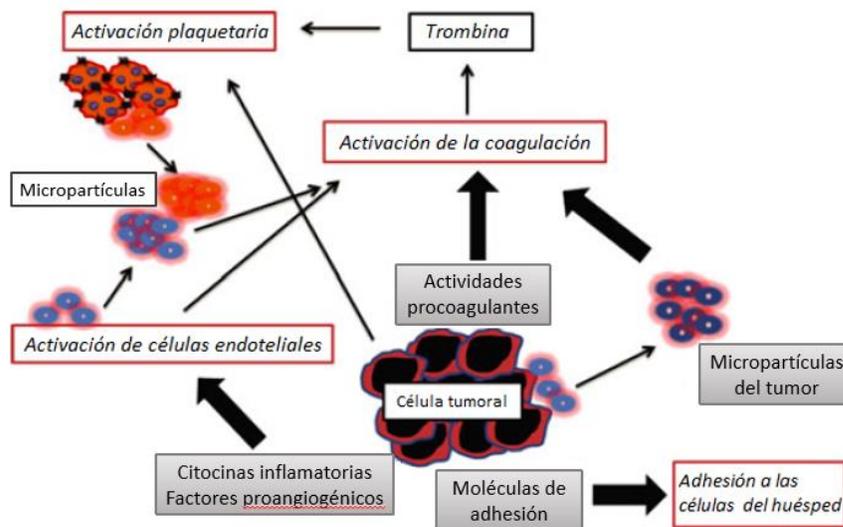


Figura 2. Interacciones tumor-sistema hemostático. Las células tumorales activan el sistema hemostático a través de varias vías. Pueden liberar factor tisular procoagulante, procoagulante del cáncer y micropartículas que pueden activar directamente la cascada de coagulación. Las células tumorales también pueden activar las células hemostáticas del huésped (células endoteliales y plaquetas) mediante la liberación de factores solubles o por contacto adhesivo directo, intensificando aún más la activación de la coagulación (Tomada y modificada de Falanga y col., 2013).

Por otra parte, el FT también cumple un papel fundamental en la generación de trombina, una enzima clave en el crecimiento tumoral y la diseminación del cáncer (Franchini y Mannucci, 2012; Wojtukiewicz y col., 2016). Otro procoagulante de las células tumorales es el procoagulante del cáncer (PC), una cisteína-proteasa de 68 kDa cuyo único sustrato conocido es

el factor X de la coagulación (Caine y col., 2002). El procoagulante del cáncer activa el factor X independientemente del factor VII de la coagulación y ha sido demostrada su expresión en células cancerosas, pero no en células normales (Caine y col., 2002; Falanga y col., 2017).

La trombina ejerce un papel fundamental en la coagulación, dado que su función principal consiste en degradar el fibrinógeno soluble para formar fibrina insoluble, la base del coágulo hemostático. Esta enzima también conocida como factor II de la coagulación, es una serina proteasa (Franchini y Mannucci, 2012; Vicci y col., 2015) sintetizada a partir de la protrombina, y su estructura única determina su especificidad de reconocimiento para numerosos sustratos. Esta especificidad depende de la competencia entre tres sitios: el sitio activo y los exositos I y II (Figura 3) (Wojtukiewicz y col., 2016).

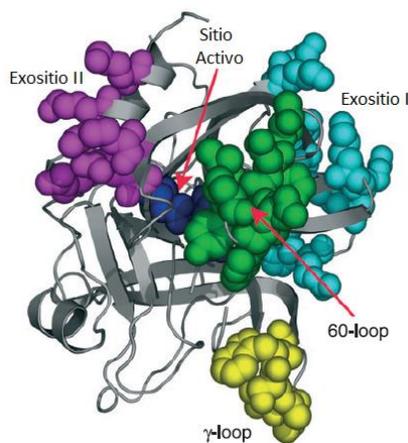


Figura 3. Estructura de la trombina. El sitio activo se muestra en color azul oscuro, el exosito I en color azul claro y el exosito II en color morado (Tomada y modificada de Crawley y col., 2007).

Además de participar en la coagulación, la trombina contribuye de manera importante en la diseminación del cáncer, activando la agregación plaquetaria inducida por el tumor, promoviendo la proliferación celular, la adhesión de células tumorales a la matriz subendotelial, el crecimiento del tumor, la generación de metástasis y la angiogénesis asociada al tumor

(Nierodzik y Karpatkin, 2006; Franchini y Mannucci, 2012). Actúa directamente sobre las células tumorales a través de los receptores activados por proteasas (PAR), o de manera indirecta mediante la generación de mallas de fibrina (Wojtukiewicz y col., 2016).

Los receptores activados por proteasas (PAR) son una familia de receptores acoplados a proteínas G que participan en la regulación de diversos procesos celulares, entre ellos la inflamación y la coagulación (Zigler y col., 2011). Se han descrito cuatro tipos de receptores: PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4 (Han y col., 2011). La activación de los PAR ocurre a través de un mecanismo de proteólisis irreversible en el que las proteasas escinden el dominio N-terminal extracelular de los PAR en sitios específicos con el fin de exponer un nuevo extremo N-terminal que actúa como un ligando atado que se une al receptor y finalmente activa la cascada de señalización intracelular (Figura 4) (Soh y col., 2010; Han y col., 2011). La trombina puede activar PAR-1, PAR-3 y PAR-4, pero no PAR-2, este último es activado por proteasas de serina tipo tripsina (Han y col., 2011).

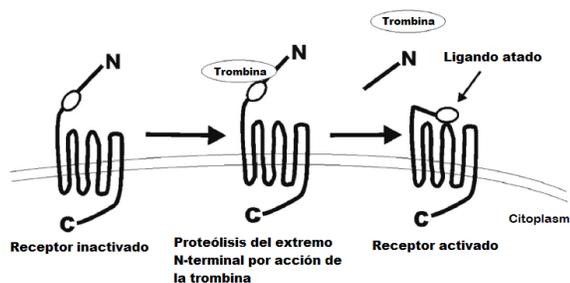


Figura 4. Estructura y mecanismo de activación de los receptores activados por proteasas (PAR). (Tomada y modificada de Wojtukiewicz y col., 2015).

Con respecto a los tipos de PAR activados por trombina, PAR-1 es el principal receptor de esta enzima; y su activación promueve la proliferación, supervivencia y transformación maligna de las células cancerosas, además de activar las plaquetas y las células endoteliales para

promover la angiogénesis y contribuir en la generación de la metástasis (García-López y col., 2010). Por otra parte, PAR-1 se encuentra sobreexpresado en varios tipos de cáncer, entre los que se encuentra el cáncer de mama, cuyos niveles de expresión están directamente relacionados con el grado de invasividad. (Yuan y Lin, 2004; García-López y col., 2010).

El estado de hipercoagulabilidad además de incrementar el riesgo de padecer eventos trombóticos (Kell y Pretorius, 2015), constituye un factor de riesgo para el desarrollo de patologías isquémicas (Martínez-Martínez y col., 2010). La isquemia es una condición en la cual las células de un tejido son privadas del oxígeno y la glucosa necesarios para mantener un metabolismo normal (Mosadegh y col., 2014), además de acumular metabolitos en su interior debido a la disminución del flujo sanguíneo hacia el tejido (La Thangue y Bandara, 2002). Esta condición tiene su origen en la obstrucción de los vasos sanguíneos por diversas razones, entre las que destaca la formación de trombos. La prolongación de la obstrucción y el estado de isquemia por mucho tiempo puede provocar necrosis del tejido (Pera, 1998).

Además, existe evidencia que reporta la asociación entre el cáncer y patologías como la isquemia digital (Taylor y col. 1987) y la isquemia cerebral (Lee y col., 2017). En el caso de la isquemia cerebral, los pacientes con cáncer presentan un alto riesgo de desarrollar esta enfermedad, lo que incrementa la morbilidad y mortalidad (Suero-Abreu y col., 2017). El cáncer se asocia a la isquemia cerebral a través de diversos mecanismos, los cuales no son muy bien conocidos, sin embargo, existe evidencia de la asociación entre hipercoagulabilidad e isquemia (Seok y col., 2010). El estado de hipercoagulabilidad parece ejercer un rol importante en el desarrollo de isquemia cerebral en pacientes con cáncer (Lee y col., 2017).

La importancia de la isquemia en cáncer se fundamenta en el hecho de que esta puede provocar hipoxia debido a la reducción de la perfusión en los tejidos (Höckel y Vaupel, 2001).

La hipoxia consiste en la disminución del aporte de oxígeno (Moreno y del Portillo, 2016). Las condiciones de hipoxia y reperfusión son conocidas por contribuir a la progresión del cáncer (Shahzad y col., 2007). Es decir, si bien la hipoxia puede provocar la muerte de las células cancerosas, la respuesta adaptativa general de estas células contra esta condición contribuye a la progresión tumoral, angiogénesis y metástasis (Gandhi y col., 2015).

En resumen, el estado de hipercoagulabilidad que se genera en pacientes con cáncer es de gran relevancia, dado que además de ser un factor de riesgo que conlleva al desarrollo de trombosis y patologías isquémicas que contribuyen de manera importante en el incremento de la morbilidad y mortalidad en estos individuos, también promueve el crecimiento tumoral y la generación de metástasis. Por esta razón, el tratamiento con drogas anticoagulantes es común en estos pacientes, ya que estas drogas no solo sirven para prevenir las complicaciones trombóticas, sino que también favorecen la reducción de generación de metástasis, lo que prolonga la supervivencia (Spek y col., 2015).

Los primeros estudios que reportaron resultados favorables con el uso de tratamiento anticoagulante en pacientes con cáncer fueron los llevados a cabo con antagonistas de la vitamina K (Spek y col., 2015). Dentro de los antagonistas de la vitamina K, la warfarina ha demostrado tener efectos anticáncer (Kirane y col., 2015), ya que al bloquear la acción de la vitamina K, se interrumpen los procesos que favorecen la supervivencia de células tumorales y la progresión tumoral, tales como la coagulación y la agregación plaquetaria (O'Rourke y col., 2015). También existe evidencia de que la heparina no fraccionada (HNF) y la heparina de bajo peso molecular (HBPM) poseen propiedades antiangiogénicas y antimetastásicas (Sanford y col., 2014). Entre los agentes anticoagulantes recientemente sintetizados se encuentran: rivaroxaban, apixaban, edoxaban y betrixaban. Estas drogas actúan inhibiendo directamente el factor Xa de la

coagulación (Barbosa, 2014) el cual es un componente central en la coagulación, ya que cataliza la conversión de la protrombina a trombina (Perzborn y col., 2011). Actualmente rivaroxaban es considerado una alternativa potencial para el manejo de trombosis asociada a cáncer, dado que se administra por vía oral y raramente presenta interacciones importantes con otras drogas (Theberge y col., 2017).

Por otra parte, las drogas que inhiben a la trombina bloquean la acción de esta enzima uniéndose a uno o dos de sus tres dominios (el sitio activo y dos exositios). Las heparinas de bajo peso molecular inhiben a la trombina de manera indirecta, ya que éstas potencian la actividad de la antitrombina al unirse simultáneamente al exositio 2 en la trombina y a la antitrombina que se une al sitio activo o catalítico de la trombina, formando un complejo heparina-trombina-antitrombina (Di Nisio y col., 2005). La antitrombina (AT) es una glicoproteína plasmática que inactiva de forma potente la trombina y otras proteasas de serina activadas, y es el mayor inhibidor de la cascada de coagulación (Aminoff, 2008; Patnaik y Moll, 2008). La catálisis de la inhibición de trombina por la antitrombina se debe principalmente a que la formación del complejo ternario heparina-trombina-AT permite el acercamiento de la trombina con la AT, formándose un complejo estable de unión covalente entre la enzima y su inhibidor (Bonow y col., 2011). Una de las desventajas de las heparinas, es que su capacidad inhibitoria se ve reducida si la trombina ya no se encuentra en su forma soluble sino unida a fibrina (Di Nisio y col., 2005).

Los inhibidores directos de trombina son drogas cuyos efectos no dependen de la acción de la antitrombina, sino que se unen directamente a la enzima y bloquean su interacción con los sustratos. Existen dos tipos de inhibidores directos de trombina: los bivalentes, que se unen al sitio activo y al exositio 1 de la trombina; y los univalentes que se unen solamente al sitio activo.

Dentro de los inhibidores bivalentes se encuentran hirudina y bivalirudina, mientras que argatroban, melagatran, ximelagatran y dabigatran forman parte del grupo de inhibidores univalentes (Di Nisio y col., 2005). La hirudina nativa y las hirudinas recombinantes lepirudina (Refludan) y desirudina, se unen de manera irreversible a la trombina, es por esta razón que no existe antídoto para la hirudina. La bivalirudina, una hirudina sintética, también es un inhibidor bivalente de la trombina, pero es escindida por ésta una vez se une, lo que hace que la enzima recupere su actividad. Debido a esto, a diferencia de la hirudina nativa y las hirudinas recombinantes, la bivalirudina produce una inhibición transitoria de la actividad de la trombina (Di Nisio y col., 2005). Actualmente, el uso de lepirudina, desirudina y bivalirudina está aprobado por la FDA en Norteamérica para ser usados como anticoagulantes en el tratamiento de TEV y otras enfermedades tromboembólicas y cardiovasculares (Lee y Ansell, 2011). En cuanto a los inhibidores de trombina univalentes, argatroban y melagatran actúan de modo similar a la bivalirudina, ya que se disocian de la trombina dejando una pequeña cantidad de la enzima libre disponible para interacciones hemostáticas, es decir, forman un complejo reversible con la trombina (Di Nisio y col., 2005). En el caso de argatroban, este inhibidor ha demostrado tener efectos antimetastásicos *in vivo* (Asanuma y col., 2012). Con respecto a la droga ximelagatran, se demostró que es efectiva en el tratamiento de TEV, sin embargo, causa toxicidad hepática (Boude, 2006). Por otra parte, dabigatran ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de TEV, sin embargo, se requiere de más estudios para demostrar sus efectos en cáncer (Dearborn y col., 2014). A este respecto, algunos resultados han sugerido que dabigatran, suministrado como etexilato de dabigatran puede inhibir la invasión y metástasis de tumores mamarios malignos, lo que indica que esta droga puede ser beneficiosa no solo en la prevención de eventos trombóticos

en pacientes con cáncer, sino también como posible terapia para tratar tumores malignos (DeFeo y col., 2010).

La dipetarudina es un nuevo inhibidor de trombina, cuyos efectos, en general, han sido poco estudiados. Es una molécula quimérica sintetizada a partir de la unión del dominio N-terminal de dipetalogastina II, el inhibidor más potente del insecto hematófago *Dipetalogaster maximus* y el péptido C-terminal de la hirudina, el inhibidor más potente de trombina, que es el fragmento bloqueante del exosito 1 (ABE 1) de la trombina. Ambos fragmentos se encuentran enlazados a través de 5 residuos de glicina. Desde el punto de vista estructural, este inhibidor posee una masa molecular de 7,5 kDa, (similar a la de la hirudina) y un valor de K_i de 446 ± 85 fM. Su afinidad por la alfa-trombina humana es aproximadamente dos veces menor que la de la hirudina recombinante. Análisis cinéticos demostraron que la dipetarudina actúa como un inhibidor de trombina de acción lenta y fuerte (López y col., 2003). Una característica notable de la dipetarudina, es que esta droga es transferida rápidamente al espacio extravascular, a diferencia de otros inhibidores de trombina como la hirudina. Por otra parte, su retorno al espacio vascular es muy lento, de este modo, puede actuar de manera prolongada en el compartimiento extravascular donde ejerce su efecto a través del bloqueo de la activación de los receptores de trombina, además dado que tiene pocos efectos en el espacio intravascular, previene hemorragias y otros efectos secundarios (López y Nowak, 2004). Todos estos atributos hacen de este inhibidor de trombina una posible opción para el tratamiento del cáncer, por lo que el objetivo principal de este proyecto consistió en evaluar el efecto de la dipetarudina sobre el crecimiento tumoral y la generación de metástasis en el modelo de cáncer de mama murino de células 4T1, un modelo altamente metastásico. Otro aspecto de interés evaluado en este trabajo, con base en la relación observada entre el estado de hipercoagulabilidad generado en cáncer y diversas

patologías trombóticas e isquémicas, fue el efecto de este inhibidor de trombina en parámetros de la coagulación e isquemia en este mismo modelo. Con lo que se busca desarrollar nuevos marcadores necesarios en la identificación de pacientes con alto riesgo de presentar eventos trombóticos e isquémicos y mejorar las estrategias terapéuticas.

ANTECEDENTES

El cáncer es considerado un grave problema de salud pública por las diversas formas de presentación y por las altas tasas de morbilidad y mortalidad que se presentan a nivel mundial. La gran mayoría de los casos de muertes asociadas a cáncer son debido a enfermedad metastásica y no a los tumores primarios (Lambert y col., 2017). De igual modo, en el cáncer de mama el desarrollo de metástasis constituye la principal causa de muerte en pacientes con esta enfermedad (Wu y col., 2016) y se estima que 30% de las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama en etapa inicial desarrollarán lesiones metastásicas durante los meses o años posteriores a la realización del diagnóstico (Redig y McAllister, 2013). Por lo que, los estudios relacionados con los procesos de metástasis resultan relevantes en la contribución a mejorar las expectativas y calidad de vida de pacientes con cáncer de mama.

Por otro lado, diversos estudios soportan la hipótesis que, las células cancerosas pueden activar el sistema de la coagulación en los pacientes con cáncer, lo que genera un estado de hipercoagulabilidad o estado protrombótico (Caine y col., 2002; Falanga y col., 2013). Incluso en pacientes sin trombosis evidente se observan valores alterados de la coagulación en pruebas de laboratorio, caracterizados por distintos grados de activación de la cascada de coagulación (Caine y col., 2002; Falanga y col., 2017). Asimismo, resultados de pruebas de laboratorio han demostrado que el proceso de formación de fibrina y fibrinólisis ocurre de forma paralela al desarrollo de cáncer y que tal proceso se ve incrementado en pacientes con metástasis (Falanga y col., 2013), lo que demuestra la continua generación de trombina *in vivo* y formación de fibrina (Falanga y Russo, 2012). Dentro de las alteraciones hemostáticas que pueden ser detectadas se encuentran los altos niveles de subproductos plasmáticos de la cascada de coagulación, tales

como el complejo trombina-antitrombina (TAT) y el dímero-D, entre otros (Falanga y col., 2013).

En relación a lo anterior, la trombosis es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con cáncer (Falanga y col., 2015). La presentación clínica más frecuente de trombosis asociada a cáncer es el tromboembolismo venoso (TEV) (Ikushima y col., 2016), y se ha observado que, en pacientes con cáncer existe un incremento superior a 7 veces de desarrollar TEV en comparación con la población general (Falanga y col., 2013), además el TEV constituye la segunda causa de muerte en pacientes con cáncer (Khalil y col., 2015).

De este modo, mientras el estado de hipercoagulabilidad generado por las células tumorales actúa como una condición de alto riesgo para el desarrollo de complicaciones tromboembólicas, la activación del sistema de coagulación influencia la biología del tumor al estar involucrada en la progresión del cáncer y la generación de metástasis. En este sentido, Nierodzik y colaboradores (1991) demostraron que la inyección intravenosa de concentraciones mínimas de trombina produce incremento en la generación de metástasis pulmonar en ratones, lo que soporta la hipótesis de que la activación de la coagulación sanguínea afecta de manera negativa el pronóstico del cáncer. Asimismo, estudios posteriores identificaron a la trombina como un factor clave en la estimulación del crecimiento tumoral y la propagación de metástasis, debido a sus efectos sobre la formación de fibrina, activación plaquetaria, permeabilidad vascular, migración celular y proliferación, e inducción de factores proangiogénicos y prometastásicos (Franchini y Mannucci, 2012). Por ejemplo, se ha detectado la presencia de trombina activa en varios tipos de tumores malignos extirpados quirúrgicamente (Wojtukiewicz y col., 2015). Por otra parte, datos experimentales indican que la hemofilia severa reduce la metástasis en ratones, posiblemente debido a que existe menor formación de trombina en estos

animales (Franchini y Mannucci, 2012). Todos estos datos sugieren que la trombina podría representar un potencial blanco para el desarrollo de terapias contra el cáncer.

En este sentido, diversas estrategias anticoagulantes dirigidas específicamente hacia la inhibición de trombina y diseñadas para reducir tanto las propiedades protrombóticas de los tumores, como su crecimiento y potencial metastásico, han sido evaluadas en estudios preclínicos y clínicos (Han y col., 2011). Dentro de los inhibidores de trombina que han sido probados en distintos tipos de cáncer se encuentran la hirudina, argatroban y dabigatran. La hirudina es un inhibidor de trombina altamente potente y específico que suprime la implantación y la metástasis tumoral espontánea en modelos murinos, prolongando la supervivencia de los animales (Wojtukiewicz y col., 2016). En este sentido, se ha demostrado que la hirudina inhibe de manera potente el desarrollo tumoral de células B16 de melanoma en los pulmones de ratones (Niers y col., 2009). De igual manera, se ha observado reducción considerable del tamaño del tumor e incremento de la tasa de supervivencia en ratones transplantados con células tumorales SKOV3 de cáncer de ovario humano pretratadas con hirudina (Yuan y Liu, 2015). En otros experimentos se demostró que la hirudina inhibe la implantación y el crecimiento de tumores de carcinoma mamario humano MDA-MB-231 en ratones desnudos y de tumores de la línea celular 4T1 de carcinoma mamario murino en ratones singénicos. Asimismo, se ha observado la inhibición de la metástasis espontánea, así como incremento en la tasa de supervivencia de los animales tratados (Hu y col., 2004).

Respecto al argatroban, el tratamiento con este inhibidor de trombina en ratones portadores de tumores, redujo el crecimiento del tumor primario, la invasión linfovascular y la metástasis de los ganglios linfáticos (Wojtukiewicz y col., 2016). De igual modo, esta droga redujo la migración de células de melanoma B16BL6 en ensayos *in vitro*, mientras que en

experimentos *in vivo* con ratones C57BL6 inoculados con células de melanoma B16, el tratamiento con este inhibidor de trombina produjo una reducción significativa del número de extremidades con lesiones metastásicas en comparación con ratones no tratados (Asanuma y col., 2004). Por otro lado, el tratamiento *in vitro* con argatroban en la línea celular MDA-231 de cáncer de mama, produjo inhibición en el aumento de la actividad del factor tisular (FT) estimulada por trombina. Asimismo, en experimentos *in vivo* con ratones inoculados con células MDA-231, se observó disminución en el número de extremidades con metástasis en comparación con el grupo control (Asanuma y col., 2012). En adición, dabigatran combinado con gemcitabina limita el crecimiento del tumor primario y previene la diseminación de células tumorales de cáncer pancreático (Shi y col., 2017). El etexilato de dabigatran, produce disminución del potencial invasivo de las células MDA-MB-231 de cáncer de mama. Esto también se observó en ensayos realizados *in vivo* con células de esta misma línea trasplantadas en modelo murino. El efecto antitumoral de esta droga también ha sido reportado en modelos *in vivo* con la línea celular 4T1 (DeFeo y col., 2010).

Por otro lado, diversos estudios soportan la hipótesis que las enfermedades isquémicas, tales como la isquemia cerebral, son complicaciones comunes en pacientes con cáncer (Kim y Lee, 2014). Resulta de gran relevancia la asociación del estado de hipercoagulabilidad con el cáncer, posiblemente como parte de la etiología de síndromes isquémicos en pacientes con cáncer; sin embargo, esta relación ha sido muy poco estudiada, debido a que, los mecanismos por los cuales se genera la hipercoagulabilidad paraneoplásica son muy complejos y no están bien descritos. Sin embargo, estudios como los desarrollados por Kim y colaboradores (2010) han permitido establecer diferencias entre pacientes con cáncer e isquemia cerebral con y sin etiologías clásicas causantes de la isquemia, y de esta forma retomar la idea de que la

hipercoagulabilidad asociada a cáncer constituye una etiología importante en la isquemia cerebral en estos pacientes (Schwarzbach y col., 2012). Adicionalmente, se ha demostrado que 67% de los eventos isquémicos en pacientes con cáncer, aparecen como múltiples eventos embólicos, lo que sugiere que la formación del coágulo y la embolización son factores importantes en la fisiopatología de la isquemia en pacientes con cáncer (Dearborn y col., 2014).

La asociación existente entre cáncer e hipoxia constituye otro de los aspectos importantes en el estudio de esta enfermedad. La hipoxia se refiere a áreas de baja tensión de oxígeno y constituye una característica de gran importancia fisiológica que se encuentra presente en todos los tumores sólidos (Rozpedek y col., 2016). El microambiente hipóxico ejerce un papel fundamental en el desarrollo y progresión del tumor (Jiang y col., 2011), así como en la invasión tumoral, metástasis y resistencia a los tratamientos actuales (Rozpedek y col., 2016). Los niveles de oxígeno en las células normales van desde 3,1% hasta 8,7%, mientras que en las células tumorales la concentración de oxígeno puede variar entre 0,01% y 3,9%, es decir, los niveles de O₂ son significativamente menores en estas células en comparación a las normales (Rozpedek y col., 2016).

La hipoxia constituye una importante barrera fisiológica para la supervivencia de la célula. Sin embargo, en el caso de las células tumorales, éstas pueden sobrevivir en concentraciones extremadamente bajas de oxígeno (Rozpedek y col., 2016). Existe evidencia de que la hipoxia puede comprometer los pronósticos clínicos en el cáncer humano. Por ejemplo, los tumores de cabeza y cuello que contienen regiones hipóxicas (presión parcial de oxígeno \leq 10 mmHg) se han asociado repetidamente a disminución de la supervivencia. En el tejido normal, las concentraciones varían entre 2,5 y 9% (20-70 mmHg) (Bose y col., 2013). Con respecto a la evidencia de hipoxia en cáncer de mama, estudios clínicos revelaron que existe una

presión parcial de oxígeno media de 65 mmHg en el tejido mamario normal. En contraste, un metanálisis de 10 estudios con más de 200 pacientes reveló que la presión parcial de oxígeno media en cáncer de mama antes de la terapia fue de 10 mmHg. La hipoxia intratumoral severa detectada en estos estudios es resultado del transporte de O₂ limitado por difusión, debido a la proliferación rápida de las células cancerosas que conduce a la falta de nutrientes a las células que se encuentran lejos de un vaso sanguíneo. Asimismo, esta condición resulta del transporte limitado de O₂ por perfusión, en el cual los vasos tumorales estructural y funcionalmente anormales no mantienen un flujo sanguíneo constante, por lo que las células cancerosas, incluso inmediatamente adyacentes a un vaso sanguíneo pueden ser hipóxicas. Las regiones de necrosis observadas en tumores sólidos avanzados reflejan las consecuencias de períodos prolongados en niveles de O₂ insuficientes para mantener la viabilidad celular (Semenza, 2016).

La investigación sobre el cáncer ha sido enfocada principalmente hacia el desarrollo de métodos y agentes para la detección de tumores en etapa temprana, así como de los agentes que inhiben el crecimiento tumoral. Los avances en la detección temprana del cáncer y su tratamiento han hecho posible que la mayoría de los tumores sólidos sean tratables o curables, siempre y cuando sean diagnosticados y tratados antes de la aparición de metástasis. Sin embargo, una vez que el cáncer se ha extendido fuera del sitio de origen es con frecuencia, poco tratable terapéuticamente y fatal (Guan, 2015). Recientemente, en el Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular, ha sido reportado *in vitro* (datos no publicados) la disminución de la proliferación del crecimiento de las líneas celulares 4T1 y de melanoma B16F10 dependiente de la concentración del inhibidor de trombina dipetarudina, con mayor eficacia al comparar el efecto con diferentes concentraciones de dabigatran y Refludan. Estos datos, junto al conjunto de evidencia planteada anteriormente, sugieren que, estrategias terapéuticas con anticoagulantes

diseñadas específicamente para inhibir trombina, podrían ser eficaces en reducir tanto las propiedades protrombóticas de tumores y su crecimiento, así como su potencial metastásico, lo que sería de beneficio en la disminución de complicaciones trombóticas y los síndromes paraneoplásicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de la dipetarudina, un inhibidor de trombina, sobre el crecimiento tumoral y la generación de metástasis en un modelo de cáncer de mama con células 4T1 en ratones BALB/c.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del tratamiento *in vivo* de la dipetarudina sobre la progresión tumoral y la generación de metástasis en un modelo de cáncer de mama en ratones.
2. Determinar el efecto de la dipetarudina sobre los parámetros de la coagulación: niveles de fibrinógeno y formación de complejo trombina-antitrombina, en ratones con cáncer de mama.
3. Determinar el efecto de la dipetarudina sobre las modificaciones producidas por isquemia en la unión de albúmina a cobalto exógeno en ratones con cáncer de mama.
4. Establecer la relación entre el estado protrombótico e isquémico con la evolución tumoral y generación de metástasis en un modelo de cáncer de mama en ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados con ratones albinos hembras de la cepa BALB/c (n=25) con edades entre 6 y 8 semanas y peso inicial entre 15 y 20 g, suministrados por el Bioterio Central del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Los animales fueron mantenidos durante todo el protocolo experimental en el bioterio satélite del Centro de Biofísica y Bioquímica (CBB) en cajas de policarbonato y rejillas metálicas de acero inoxidable en un ambiente con temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con inicio de la luz a las 7:00 a.m. y acceso a agua y comida *ad libitum*. Posterior a las 48 horas de ambientación, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos experimentales: grupo Control-Mama (n= 11) y grupo Dipetarudina-Mama (n= 14). Todos los procedimientos y protocolos experimentales fueron aprobados previamente por la Comisión de Bioética para Investigación en Animales (COBIANIM) del IVIC, bajo el número COBIANIM2016-07.

Modelo tumoral

Para el modelo tumoral ensayado se usó la línea celular 4T1 de carcinoma mamario murino, la cual genera un tumor espontáneo que se asemeja al cáncer de mama humano y permite reproducir su evolución.

Cultivo de células

La línea de células 4T1 de carcinoma mamario murino derivadas de ratones BALB/c fue obtenida del Laboratorio de Patología Celular y Molecular del Centro de Medicina Experimental del IVIC. Las células fueron mantenidas en la Unidad de Cultivo de Células y Tejidos del CBB del IVIC, las mismas fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, San Luis, MI, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL) y glutamina 2 mmol/L e incubadas a 37 °C con atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y humedad relativa del 95%.

Inoculación de células tumorales

Para el desarrollo del tumor primario todos los ratones se inocularon con 1×10^6 células 4T1 contadas en cámara de Neubauer y suspendidas en 0,1 mL de PBS pH 7,4. El uso de esta cantidad de células asegura un desarrollo tumoral más rápido en comparación con el uso de una concentración de células en un orden de magnitud de 10^3 (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000). Las células fueron implantadas debajo del cojinete de la segunda glándula mamaria derecha de los ratones mediante una inyección única por vía subcutánea utilizando jeringas de insulina con agujas 27G. Los ratones fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos en el bioterio satélite del CBB.

Evaluación del crecimiento del tumor

Una vez palpables los tumores, se procedió a realizar mediciones cada dos días del diámetro mayor y el diámetro menor de cada tumor con un vernier (Figura 5). El volumen del

tumor se calculó en centímetros cúbicos (cm^3) de acuerdo con la fórmula: $V = A \times B^2 \times 0,5$ (A es el diámetro mayor, y B es el diámetro menor del tumor) (Tomayko y Reynolds, 1989).



Figura 5. Medición del tumor. El volumen tumoral fue determinado mediante la medición de los diámetros menores y mayores del tumor con el uso de un vernier.

Tratamiento

El tratamiento fue iniciado una vez los tumores alcanzaron un tamaño promedio de $0,1365 \text{ cm}^3$ (aproximadamente 2 semanas después de la inoculación de células tumorales). El tratamiento consistió en la administración vía intraperitoneal (i.p) de 2 mg/kg de peso del inhibidor de trombina dipetarudina, preparado en solución de NaCl al 0,9%, el cual se administró diariamente durante 21 días continuos (Figura 6). La dosis seleccionada es considerada subterapéutica (sub-anticoagulante) respecto al rango terapéutico reportado para la r-Hirudina utilizada en modelo murino (Guo y col., 2008). Se usó una dosis subterapéutica a fin de disminuir el riesgo de hemorragia en los animales. El grupo control recibió igual número y régimen de inyecciones del vehículo (solución de NaCl al 0,9%) durante 21 días. El tratamiento se llevó a cabo entre las 8:00 am y las 11:00 am y los animales fueron pesados y monitorizados diariamente.



Figura 6. Inyección vía intraperitoneal. La figura representa la forma de inyección de dipetarudina, a través de la vía intraperitoneal en el cuadrante inferior izquierdo.

Toma de muestras de sangre

Los animales fueron anestesiados 24 horas después de la última dosis de dipetarudina mediante la administración por vía i.p. de tiopental sódico en una dosis de 40 mg/kg de peso. Bajo anestesia y previa asepsia y antisepsia de la región torácica se extrajo sangre de los animales mediante punción cardíaca (Figura 7). La sangre obtenida fue distribuida en dos tubos: un primer tubo con solución anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y glucosa) en una proporción sangre:ACD de 9:1 para la obtención del plasma usado en los ensayos de fibrinógeno y formación del complejo trombina-antitrombina (TAT) y un segundo tubo sin anticoagulante; para la obtención del suero usado en el ensayo de determinación de albúmina modificada por isquemia (IMA). El plasma fue el sobrenadante obtenido luego de centrifugar la fracción de sangre anticoagulada con ACD a 1500 x g durante 20 minutos a 4°C, mientras que el suero fue el sobrenadante que se obtuvo en la fracción de sangre correspondiente previa formación del coágulo (entre 60 a 90 minutos) luego de centrifugar a 1500 x g durante 20 minutos a 4°C. Todas las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada Digicen 21 (Ortoalresa, Madrid, España). Las muestras de plasma y suero fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de usarlas.



Figura 7. Extracción de sangre por punción cardíaca. La punción se realiza en la unión auriculoventricular del corazón.

Necropsia (autopsia) y obtención de tumor y órganos

Posterior a la extracción de sangre, se realizó perfusión transcardíaca con 60 mL de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 conteniendo ácido ascórbico al 0,1 % (p/v). Seguidamente, se les realizó necropsia. Se extrajo el tumor primario mediante disección por planos, a fin de medirlo y pesarlo. Asimismo, se extrajeron los pulmones, el hígado y el bazo a fin de pesarlos y cuantificar macrometástasis superficiales presentes. En el cerebro solo se determinó la presencia de macrometástasis superficiales. Otro aspecto evaluado fue la presencia/ausencia de ganglios linfáticos axilares, ganglios cervicales y ganglios paravertebrales. La necropsia y los procedimientos posteriores a esta también fueron realizados en los animales fallecidos antes del sacrificio.

Determinación de complejos trombina-antitrombina (TAT)

Para medir la actividad procoagulante *in vivo* en el modelo y evaluar el efecto del tratamiento con dipetarudina sobre esta actividad, se realizó la cuantificación de la concentración de complejos trombina-antitrombina (TAT) circulantes en el plasma. Estos complejos son usados como un biomarcador de generación de trombina. La determinación se realizó mediante ensayo

inmuno-enzimático (ELISA) con el kit disponible comercialmente Thrombin-Antithrombin complex (TAT) (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo, que es un ELISA tipo sándwich, se basa en el uso de microplacas con pozos recubiertos con un anticuerpo de captura específico para trombina, al cual se une la trombina y los complejos TAT presentes en la muestra. Luego de remover cualquier sustancia no unida mediante lavado, se añade a la placa un anticuerpo dirigido a antitrombina conjugado a una peroxidasa, el cual se une a los complejos TAT capturados. Después de lavar para retirar los anticuerpos no unidos, se añade a la placa el sustrato de la peroxidasa. La intensidad del color resultante de esta reacción es proporcional a la concentración de complejos TAT presentes en la muestra y se determina midiendo la absorbancia. En este experimento, la absorbancia se midió en un lector de placas Tecan Infinite M200® PRO (Tecan Trading AG, Männedorf, Suiza) a una longitud de onda de 490 nm y la concentración del complejo TAT presente en las muestras se calculó mediante comparación con una curva de estándares de diferentes concentraciones del complejo TAT.

Determinación de niveles de fibrinógeno

La concentración plasmática de fibrinógeno fue determinada mediante el protocolo descrito por Ratnoff y Menzie (1951), en este método, el fibrinógeno es separado de otras proteínas plasmáticas con trombina en presencia de iones de Ca^{2+} . El protocolo fue modificado y adaptado para microplacas de 96 pozos. Brevemente, 40 μL de muestra de plasma fueron dispensados en los respectivos pozos y mezclados con 10 μL de solución de trombina (100 U/mL) preparada en buffer de trombina ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 250 mM, albúmina sérica humana al 0,05% pH 6,5 y CaCl_2 0,1 M. Luego de incubación durante 30 min a 37 °C, el coágulo formado

fue separado y lavado 3 veces con 150 μL de solución NaCl al 0,9%. Posteriormente, se adicionaron 50 μL de solución NaOH 2N al coágulo lavado y secado, la placa fue incubada durante 10 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ para completa disolución del coágulo. Finalmente, 150 μL de solución Biuret (CuSO_4 15 mM, $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 150 mM, NaOH 0.2 M y KI 7,5 mM) fue agregado a cada pozo. Al mismo tiempo, una curva de calibración de estándares de fibrinógeno bovino (20 μg – 5 μg) fue preparada (Figura 8). La absorbancia del ensayo fue medida a 540 nm en un lector de placas Tecan Infinite M200[®] PRO (Tecan Trading AG, Männedorf, Suiza). El contenido de fibrinógeno fue calculado comparando los valores con la curva de calibración de estándares.

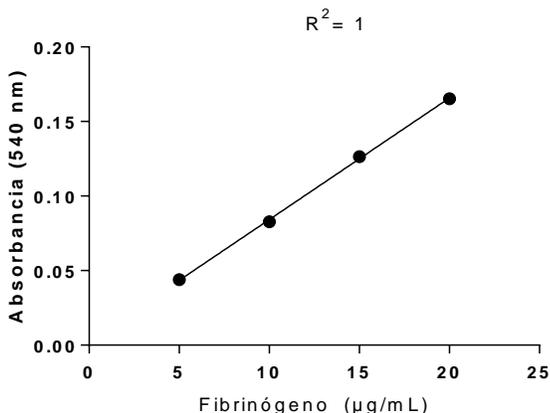


Figura 8. Curva de estándares de fibrinógeno. La figura representa las diferencias de absorbancia en función de diferentes concentraciones de fibrinógeno en un ensayo realizado con duplicados en microplacas de 96 pozos. El análisis fue realizado mediante regresión lineal.

Determinación de albúmina modificada por isquemia (IMA)

Los niveles de IMA en muestras de suero fueron determinados mediante el ensayo colorimétrico de unión de albúmina a cobalto descrito por Bar-Or y col., (2000) con modificaciones y adaptaciones a microplacas de 96 pozos. Brevemente, 30 μL de suero fueron incubados con 10 μL de solución de CoCl_2 al 0,1% preparado en solución de NaH_2PO_4 50 mM pH 7,4 (Lee y col., 2014) durante 10 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ para permitir la unión adecuada entre

albúmina y cobalto. Seguidamente, se adicionaron a la mezcla 10 μ L de solución de ditioneitol (DTT) al 0,75% (preparado en H₂O destilada) para el desarrollo del color, la placa fue incubada durante 5 minutos a 37°C. Después de 2 minutos, la reacción fue detenida con la adición de 150 μ L de NaCl al 0,9%. La absorbancia del ensayo fue medida a 470 nm en un lector de placas Tecan Infinite M200® PRO (Tecan Trading AG, Männedorf, Suiza). Los valores de IMA se reportaron en unidades de absorbancia (ABSU) tal como lo reportan Bar-Or y col., (2000)

Análisis de los datos

Los resultados se presentaron como las medias \pm el error estándar de la media (EEM). Las diferencias entre las medias se compararon mediante pruebas t de Student no pareada y por análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico Graphpad Prism versión 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU.). La significancia estadística de las diferencias fue considerada cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efecto de la administración de dipetarudina sobre el peso corporal de ratones BALB/c

Durante el tratamiento con dipetarudina a una dosis de 2 mg/kg de peso, dosis considerada sub-terapéutica (sub-anticoagulante), se observó incremento progresivo y continuo del peso corporal en ambos grupos de experimentación posterior a la inoculación de células 4T1. Sin embargo, después del tercer día de iniciada la administración de dipetarudina se observó reducción significativa ($p=0,0016$) en el peso de los animales tratados ($13\pm0,66$ g) en comparación con el peso de los animales del grupo control ($17\pm0,76$ g). La disminución en el peso corporal de los animales tratados con la dipetarudina se mantuvo hasta el final del tratamiento (Figura 9).

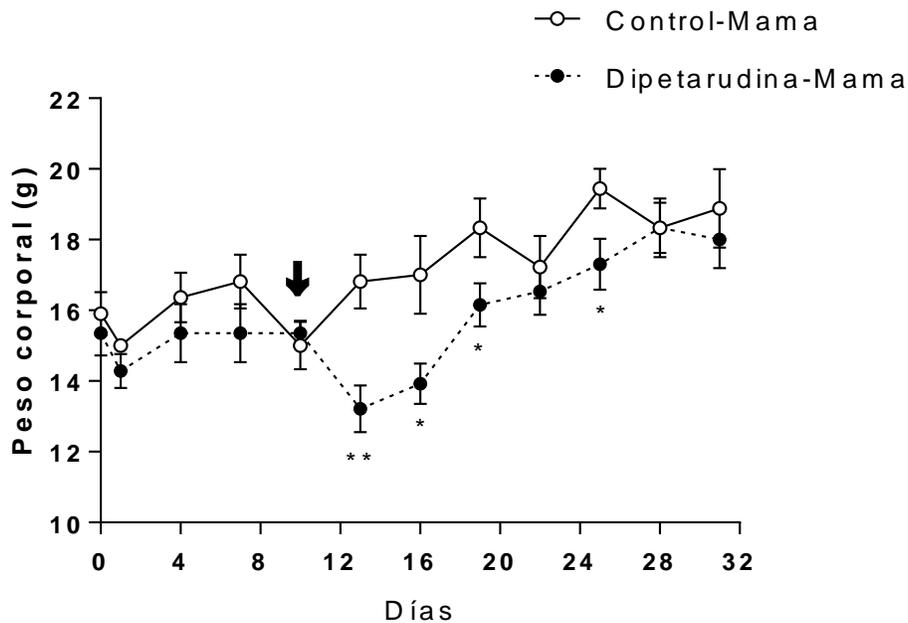


Figura 9. Variación del peso corporal de ratones BALB/c con cáncer de mama. Los datos corresponden a ratones del grupo control tratados con el vehículo ($n=11$) y a los tratados con dipetarudina ($n=14$). El tratamiento se inició el día 10 post-inoculación de las células 4T1 (señalado con flecha). Los valores son presentados como el promedio \pm EEM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; respecto al grupo control.

Efecto del tratamiento con dipetarudina sobre la mortalidad de ratones BALB/c con cáncer de mama

La administración de dipetarudina no produjo diferencias significativas ($p=0,4079$) en el porcentaje de mortalidad entre el grupo de ratones tratados con el vehículo (control) y el grupo de ratones tratados con dipetarudina (Figura 10).

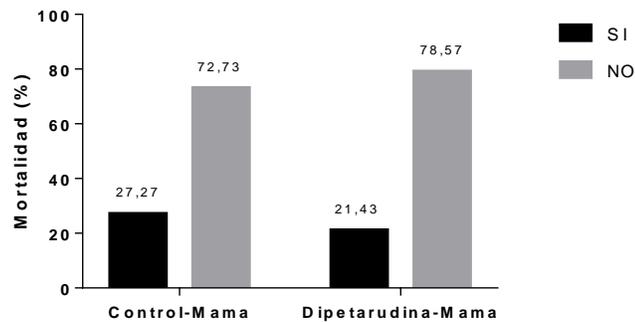


Figura 10. Porcentaje de mortalidad de ratones BALB/c con cáncer de mama. Porcentaje de mortalidad en ratones tratados con el vehículo (3/11) y ratones tratados con dipetarudina (3/14). Si: % de Fallecidos; No: % de No fallecidos. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba F de Fisher.

Características morfológicas evolutivas del carcinoma mamario murino

El modelo de tumor primario generado por la inoculación de células 4T1 presentó diferentes etapas de progresión hasta la formación tumoral (Figura 11). En primer lugar, aparece en el sitio de inoculación un área con inflamación local, caracterizada por signos de flogosis y cambios de temperatura local, seguidamente se aprecia una etapa de formación de masa palpable de consistencia irregular y no bien definida. Estas primeras etapas presentan diferencia en los días de evolución (Tabla 1). Posteriormente, se presenta una formación tumoral sólida definida que progresa en el tiempo.

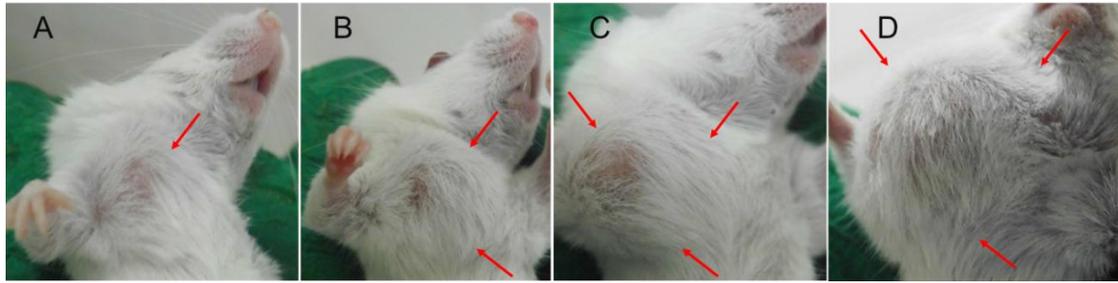


Figura 11. Etapas evolutivas del tumor primario de células 4T1 en ratones BALB/c. Imágenes representativas de las etapas de: **A)** Inflamación local. **B)** Formación de masa palpable. **C)** Tumor en etapa temprana. **D)** Tumor en etapa tardía. Cada etapa es señalada con flecha.

Tabla 1. Etapas evolutivas de la formación tumoral.

Etapas	Días
Inflamación	$4,6 \pm 0,6$
Masa palpable	$2,6 \pm 0,31$

Los datos representan el promedio \pm EEM de los días de las etapas de evolución tumoral luego de la inoculación de células 4T1 en ratones BALB/c.

Efecto del tratamiento con dipetarudina sobre la necrosis tumoral

Áreas o focos de necrosis tumoral son frecuentemente observadas en diferentes tipos de cáncer (Proskuryakov y Gabai, 2010). En nuestro modelo de cáncer de mama con células 4T1, se observó la presencia de necrosis tumoral, caracterizada por un desarrollo global, extensivo y progresivo en el tumor de ratones del grupo control, mientras que en ratones tratados con dipetarudina, se observó una zona de necrosis focalizada y delimitada que no progresó con respecto a lo observado en el grupo control (Figura 12).

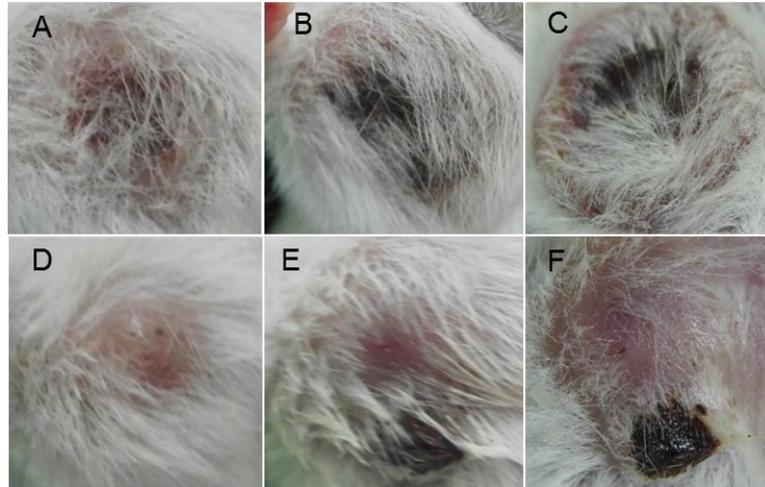


Figura 12. Desarrollo de necrosis tumoral en ratones BALB/c. Imágenes representativas correspondientes a la formación de áreas de necrosis en el tumor de ratones del grupo control (A-C) y ratones tratados con dipetardina (D-F).

El tratamiento con dipetardina disminuye el crecimiento tumoral *in vivo*

Posterior a la consolidación del tumor sólido se observó progresión continua en el crecimiento tumoral, el mismo fue evaluado como volumen tumoral. Dicha progresión se mantuvo durante todo el periodo de tratamiento con el inhibidor de trombina, la dipetardina. Sin embargo, luego del día 5 de iniciado el tratamiento, se observó la reducción significativa ($p=0,0013$) del volumen tumoral en el grupo de ratones que recibieron la droga ($0,26\pm 0,027\text{ cm}^3$) en comparación con el grupo tratado con el vehículo ($0,49\pm 0,066\text{ cm}^3$). Aunque el crecimiento tumoral fue progresivo en el grupo tratado con dipetardina, diferencias significativas en el volumen tumoral fueron observadas en los días 7, 11, 13, 15, 17 y 21 del tratamiento con respecto al grupo control (Figura 13).

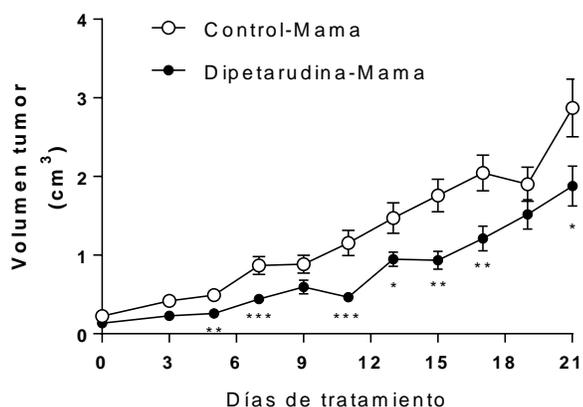


Figura 13. Efecto de la administración de dipetarudina sobre el crecimiento tumoral in vivo en ratones BALB/c. Los valores son presentados como el promedio \pm EEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al grupo control tratado con el vehículo. Grupo Control-Mama (n=11), grupo Dipetarudina-Mama (n=14).

Una vez finalizado el protocolo experimental con la administración de dipetarudina, fue observada la reducción del volumen tumoral con diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0034$) en el grupo de ratones que recibieron el tratamiento ($1,878 \pm 0,2538 \text{ cm}^3$) al compararlos con el grupo de ratones tratados con el vehículo ($2,871 \pm 0,3662 \text{ cm}^3$) (Figura 14).

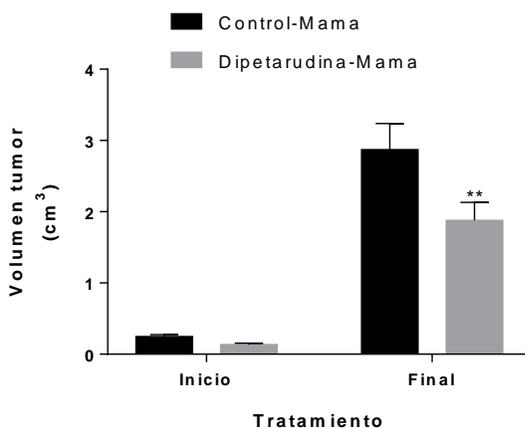


Figura 14. Efecto del tratamiento con dipetarudina en el crecimiento tumoral in vivo en ratones BALB/c. Volumen del tumor al inicio y al final del tratamiento. Los valores son presentados como el promedio \pm EEM. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control tratado con el vehículo. Grupo Control-Mama (n=11), grupo Dipetarudina-Mama (n=14).

Luego de la autopsia fue realizada la resección de los tumores de los ratones de ambos grupos. La medición *in situ* de los tumores resecados demostró que dipetarudina produce la

reducción significativa ($p=0,0259$) en el volumen de los tumores extirpados de los ratones que recibieron la droga ($2,5 \pm 0,29 \text{ cm}^3$) en contraste con el volumen de los tumores extirpados de ratones tratados con el vehículo ($4 \pm 0,63 \text{ cm}^3$) (Figura 15 A). Asimismo, se observó que, dentro de las características morfológicas macroscópicas, los tumores del grupo control presentaron mayor tamaño y una conformación de masa multilobuladas comparados con los del grupo tratado con dipetarudina, los cuales presentaron una configuración definida de aspecto único y sólida (Figura 15 B).

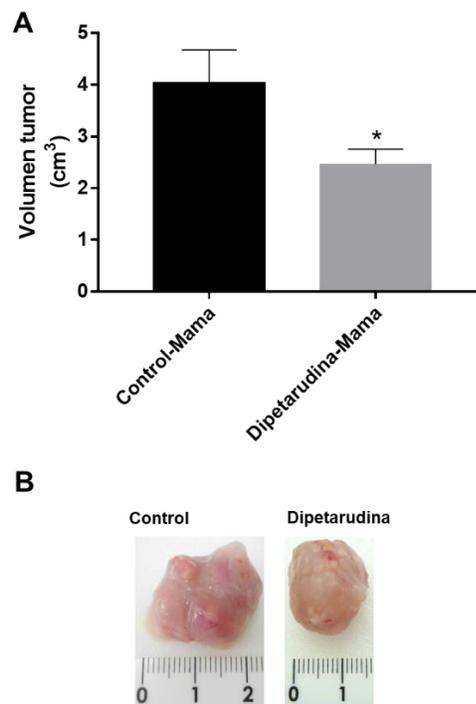


Figura 15. Volumen del tumor mamario extirpado de ratones BALB/c. A) Volumen del tumor mamario primario de ratones tratados con el vehículo ($n=11$) y tratados con dipetarudina ($n=14$). Los valores son presentados como el promedio \pm EEM. * $p<0,05$ con respecto al grupo Control-Mama. B) Imágenes representativas donde se observan las características morfológicas macroscópicas.

Efecto de la administración de dipetarudina en la generación de metástasis

El efecto del tratamiento con dipetarudina sobre la presencia de macrometástasis superficiales en el modelo de cáncer de mama de células 4T1 fue evaluado. Se observó la presencia de múltiples lesiones metastásicas en los pulmones, asimismo, se reporta la presencia

de metastásis en el corazón de los ratones del grupo control, con menor frecuencia en los ratones del grupo que recibió tratamiento con dipetarudina. No se observó la presencia de metástasis en hígado ni en el bazo, tampoco en el cerebro (Figura 16).

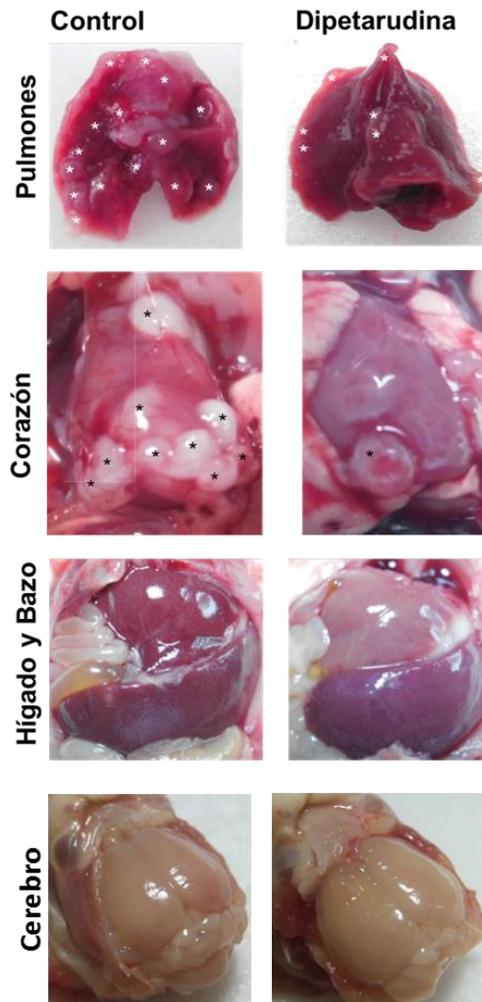


Figura 16. Características macroscópicas de las metástasis en órganos de ratones BALB/c con cáncer de mama. Imágenes representativas correspondientes a macrometástasis superficiales en pulmones, corazón, hígado, bazo y cerebro *in situ* de ratones tratados con el vehículo y tratados con dipetarudina. (*): Presencia de metástasis.

El tratamiento con dipetarudina produjo reducción significativa ($p=0,0432$) en el número de metástasis observadas en los pulmones de ratones tratados ($7,3\pm 1$) en contraste con el número de metástasis pulmonares observadas en ratones del grupo control ($11\pm 1,1$). De igual forma, se observó diferencia significativa ($p=0,0257$) en el número de metástasis presentes en los

corazones de los ratones tratados con dipetarudina ($1,8\pm 0,16$) con respecto al número de metástasis observadas en los corazones de los ratones del grupo control ($2,8\pm 0,37$) (Figura 17).

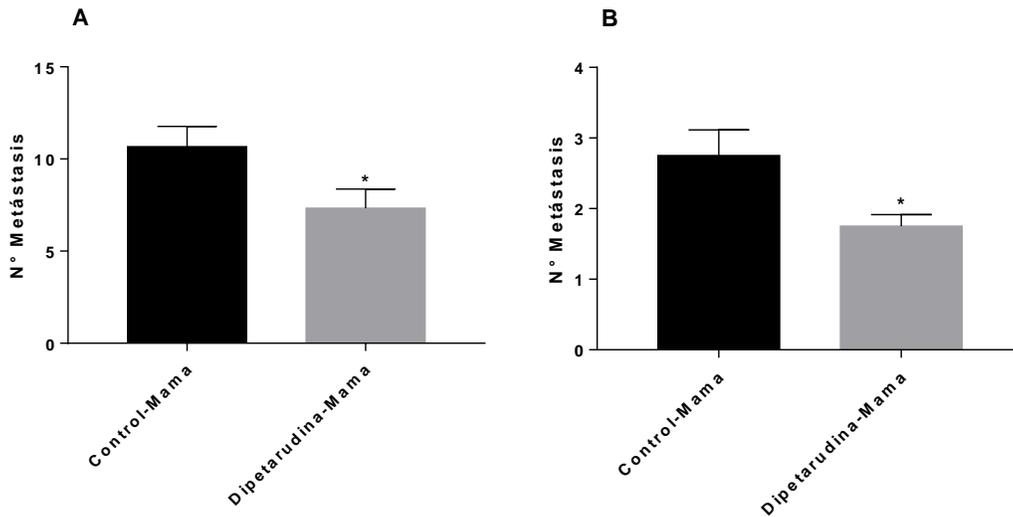


Figura 17. Número de metástasis en órganos de ratones BALB/c con cáncer de mama. En (A) se muestra el número de metástasis en pulmones y en (B) el número de metástasis presentes en los corazones de ratones tratados con el vehículo (n=9) y ratones tratados con dipetarudina (n=11). Los valores son presentados como el promedio±EEM. *p<0,05 con respecto al grupo control tratado con el vehículo.

Efecto de la dipetarudina sobre la invasión y metástasis en ganglios linfáticos

La presencia de ganglios linfáticos axilares, cervicales y paravertebrales tanto en ratones del grupo control como en ratones tratados con dipetarudina fue cuantificada, sin embargo, se observó un menor número de ganglios axilares y cervicales en el grupo de ratones tratados con dipetarudina respecto al grupo control (Figura 18).

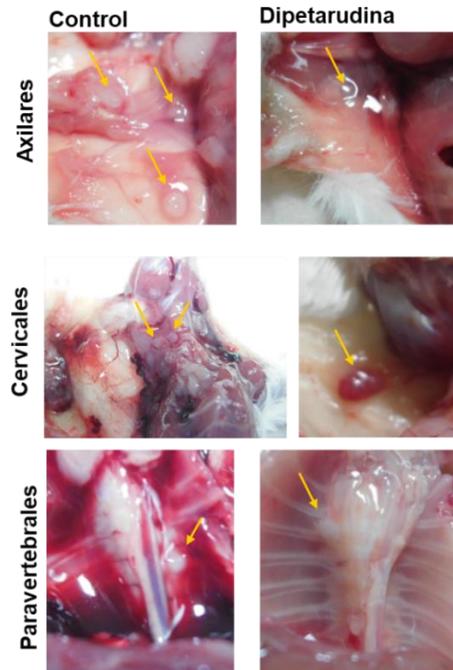


Figura 18. Presencia de ganglios en ratones BALB/c. Imágenes representativas de ganglios linfáticos en ratones tratados con el vehículo y ratones tratados con dipetarudina. Las flechas señalan la ubicación de los ganglios.

Se demostró que el tratamiento con dipetarudina produjo la disminución significativa ($p=0,0189$) en el número de ganglios axilares presentes en los ratones que recibieron el tratamiento ($1,2\pm 0,15$) en comparación con los ratones del grupo control ($2\pm 0,27$). Efectos similares fueron observados con respecto a la presencia de ganglios cervicales, el número de ganglios fue significativamente menor ($p=0,0285$) en los ratones tratados con dipetarudina ($1,5\pm 0,5$) al ser comparados con los ratones del grupo control ($2,8\pm 0,2$). No hubo ninguna diferencia ($p=0,8457$) en el número de ganglios paravertebrales presentes en los ratones del grupo control ($1,5\pm 0,5$) y el grupo tratado con dipetarudina ($1,4 \pm 0,24$) (Figura 19).

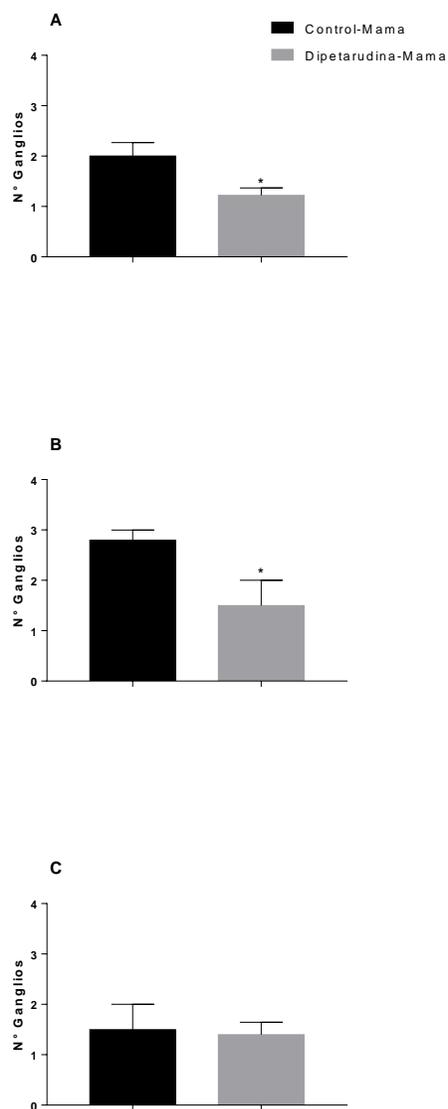


Figura 19. Presencia de ganglios linfáticos en ratones BALB/c con cáncer de mama. Número de ganglios linfáticos A) Axilares B) Cervicales y C) Paravertebrales presentes en ratones inoculados con células 4T1 del grupo control (n=9) y en ratones tratados con dipetarudina (n=11). Los valores son presentados como el promedio±EEM. *p<0,05 con respecto al grupo control tratado con el vehículo.

Efecto del tratamiento con dipetarudina sobre el peso de los tumores y órganos

El tratamiento con dipetarudina no produjo diferencias estadísticamente significativas en el peso de tumores y órganos de ratones de ambos grupos (Figura 20).

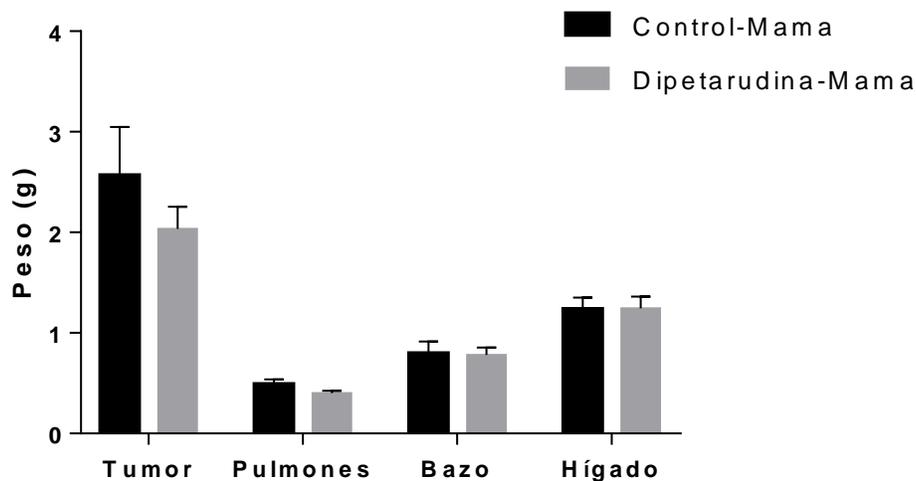


Figura 20. Peso de tumores y órganos extirpados de ratones BALB/c con cáncer de mama. Los valores son presentados como el promedio \pm EEM. Grupo Control-Mama (n=11) y grupo Dipetarudina-Mama (n=14).

Efecto de la administración de dipetarudina en la concentración de complejos TAT en ratones con cáncer de mama

La determinación de la concentración de complejos TAT fue significativamente mayor ($p=0,0004$) en el plasma de ratones del grupo control ($46\pm 7,7$ pg/L) en comparación con las obtenidas en el plasma de ratones sanos ($6,8\pm 1,4$ pg/L). Asimismo, se observó que, la formación de complejos TAT determinada en el plasma fue significativamente menor ($p=0,0052$) en los ratones tratados con dipetarudina (19 ± 5 pg/L) al comparar los valores obtenidos en el plasma de ratones del grupo control (Figura 21).

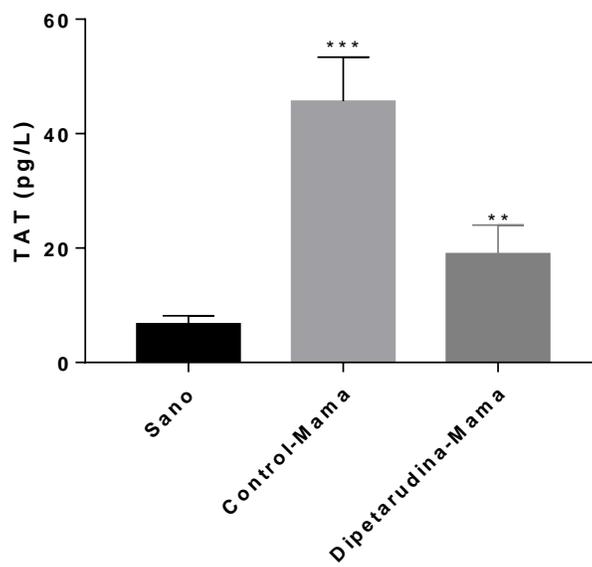


Figura 21. Efecto de la administración de dipetarudina en la formación de complejos TAT en el plasma de ratones BALB/c con cáncer de mama. El plasma se obtuvo de ratones sanos (n=7), no tratados (n=8) y tratados con dipetarudina (n=11). Los valores son presentados como el promedio±EEM. **p<0,01 respecto al grupo control tratado con el vehículo. ***p<0,001 respecto al grupo de ratones sanos.

Efecto de la dipetarudina sobre la concentración de fibrinógeno

La administración de dipetarudina produjo la reducción significativa (p=0,0003) de los niveles de fibrinógeno en el plasma de los ratones que recibieron el tratamiento (77±3,1 µg/mL) en contraste a los valores observados en los ratones del grupo control (112±8 µg/mL). Al comparar los valores obtenidos para el grupo control con los obtenidos para el grupo de ratones sanos (90±3,1 µg/mL), se observó un incremento estadísticamente significativo (p=0,0298) (Figura 22).

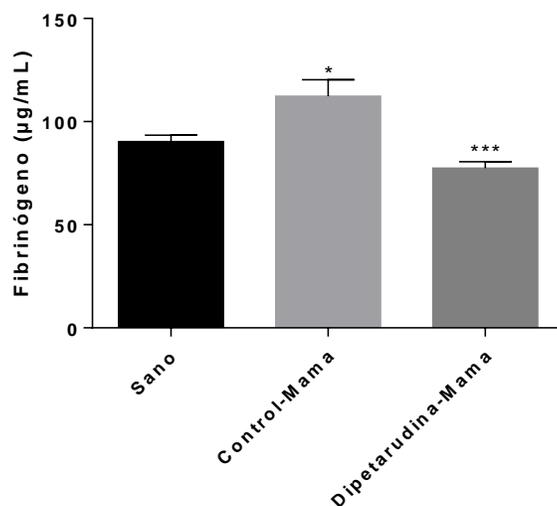


Figura 22. Efecto del tratamiento con dipetarudina en la concentración de fibrinógeno en el plasma de ratones BALB/c con cáncer de mama. La concentración de fibrinógeno fue determinada en el plasma de ratones sanos (n=7), ratones control (n=8) y ratones tratados con dipetarudina (n=11). Los valores son presentados como el promedio±EEM. *p<0,05 respecto al grupo de ratones sanos. ***p<0,001 respecto al grupo control tratado con el vehículo.

Efecto de la administración de dipetarudina sobre los niveles de albúmina modificada por isquemia (IMA)

Al estudiar la presencia de fenómenos de isquemia en el modelo de cáncer de mama de células 4T1, la determinación de los niveles de IMA en el suero demostró la disminución significativa (p=0,005) en los ratones que recibieron el tratamiento (0,1636± 0,01 ABSU) respecto a los niveles de los ratones del grupo tratado con el vehículo (0,2645± 0,03 ABSU). De igual forma, al realizar la comparación de los niveles de IMA entre el grupo control y un grupo de ratones sanos (0,1858±0,01 ABSU), se observaron valores con un incremento significativo (p=0,0402) en el grupo de ratones tratados con el vehículo (Figura 23).

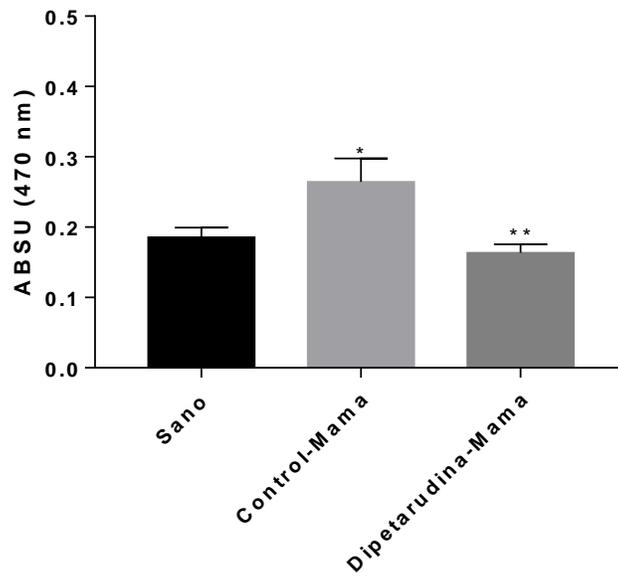


Figura 23. Efecto del tratamiento con dipetarudina sobre los niveles de albúmina modificada por isquemia (IMA) en el suero de ratones BALB/c con cáncer de mama. El suero se obtuvo de ratones sanos (n=8), ratones control (n=8) y ratones tratados con dipetarudina (n=11). Los valores son presentados como el promedio±EEM. *p<0,05 respecto al grupo de ratones sanos. **p<0,01 respecto al grupo control tratado con el vehículo.

DISCUSIÓN

Evaluación del tratamiento con dipetarudina en un modelo de cáncer de mama de células 4T1.

En el presente estudio se muestra la primera evidencia experimental in vivo del uso de la dipetarudina, un potente inhibidor directo de trombina (López y col., 2003) en un modelo altamente metastásico, generado con la línea celular 4T1, derivada de carcinoma mamario murino, que asemeja el cáncer de mama en humanos (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000).

Dentro de los posibles efectos observados con la administración de dipetarudina, se demostró variaciones significativas en cuanto a la progresión del peso corporal en los ratones que recibieron el tratamiento. Estas observaciones pueden ser sustentadas en que posiblemente, el efecto sobre la proliferación celular del tumor, también produce variaciones in vivo sobre el peso del tumor, lo que puede influir en la disminución del peso corporal. Asimismo, aun cuando la ganancia de peso es relativamente inferior a la observada para los ratones del grupo control, se observa que todos los ratones del grupo tratado con dipetarudina aumentan de peso de manera progresiva, lo que descarta la presencia de efectos tóxicos de la dipetarudina.

Por otro lado, la generación del tumor primario de células 4T1 es aproximadamente rápida, la misma presenta una fase de inflamación local de aproximadamente 5 días de duración, seguido de una etapa de formación de una masa palpable, irregular e indefinida de aproximadamente 3 días de duración. En este sentido, ha sido demostrado que la fase de inflamación local juega un papel importante en las diferentes fases de la progresión del crecimiento tumoral, que incluyen la etapa de iniciación, conversión maligna, invasión y metastásis (Grivennikov y col., 2010). Asimismo, se ha descrito que la respuesta inflamatoria estimula el microambiente tumoral que favorece el proceso neoplásico involucrado en la

supervivencia y migración de las células tumorales, así como en la evasión de la respuesta del sistema inmunitario (Coussens y Werb, 2002). Adicionalmente, se describe que trombina favorece la extensión de proceso inflamatorio en el microambiente tumoral por activación del sistema del complemento y de procesos proangiogénicos (Danckwardt y col., 2013). Por lo que nuestros resultados con dipetarudina pueden sugerir un posible bloqueo de los mencionados procesos.

Con respecto al desarrollo de áreas o focos de necrosis, observamos que el tratamiento con dipetarudina produce reducción del área de necrosis, asimismo, el área se encuentra focalizada en un punto del tumor, sin llegar a extensión y propagación, condiciones muy diferentes a las observadas en los animales no tratados y que presentaron áreas de necrosis tumoral. En este sentido, se ha demostrado que, la presencia de múltiples áreas de necrosis aumenta la condición de hipoxia de las células tumorales, condición que favorece la activación de macrófagos, los cuales responde a la condición de hipoxia con la sobre regulación de factores de transcripción tales como, el factor de hipoxia inducible 1 y 2, los cuales a su vez permiten la activación de rutas mitogénicas proinvasivas, proangiogénicas y prometastásicas (Lewis y Murdoch, 2005). Nuestros resultados demuestran que la dipetarudina produce el bloqueo de la respuesta ante la condición de hipoxia, lo que se observa en la reducción de los focos de necrosis y retracción del tamaño tumoral.

Por otro lado, este estudio muestra que no existe diferencias en el porcentaje de mortalidad entre los grupos de experimentación, lo que implica la complejidad del modelo y que el cáncer de mama involucra desde el punto de vista de la biología del tumor, la participación de otros procesos diferentes a la activación del sistema de coagulación.

Efecto del tratamiento *in vivo* de la dipetarudina sobre la progresión tumoral y la generación de metástasis

La administración de dipetarudina, a una dosis de 2 mg/kg de peso, dosis considerada sub-terapéutica (sub-anticoagulante), produjo disminución del volumen del tumor durante el tiempo de duración del protocolo experimental (21 días). Asimismo, se observó que dipetarudina produce la reducción en un 35% del tamaño del tumor al final del tratamiento. Nuestros resultados sugieren que, la inhibición de trombina por dipetarudina puede reducir *in vivo* la tumorigenicidad del cáncer de mama. En este sentido, ha sido demostrado que trombina interactúa con las células tumorales y el microambiente tumoral, a través de la activación de los receptores activados por proteasas (PAR), lo que induce el crecimiento tumoral y la angiogénesis, así como la adhesión de las células tumorales a las plaquetas (Wojtukiewicz y col., 2016). Asimismo, estudios previos han demostrado que la trombina puede tener una serie de efectos indirectos en la promoción de la progresión tumoral *in vivo*, incluido el escape de la vigilancia del sistema inmunitario, a través de la agregación plaquetaria inducida por el tumor y el aumento de la angiogénesis (Wojtukiewicz y col., 2015). En nuestro estudio, dipetarudina podría estar inhibiendo estos efectos indirectos en el modelo de cáncer de mama ensayado.

Igualmente, se ha demostrado que el sistema de la coagulación se encuentra activado en los pacientes con cáncer, lo que es considerado de importancia en la biología del tumor (Falanga y col., 2013). Dicha activación permite la generación activa de trombina, lo que favorece la activación subsiguiente de los procesos de angiogénesis, proceso de gran importancia en la promoción de la progresión tumoral (Siller-Matula y col., 2011).

Por otro lado, resultados similares a los presentados en nuestro estudio han sido reportados con el uso de otros inhibidores de trombina, por ejemplo, Schulze y col. (2008)

reportaron disminución del tamaño tumoral con el tratamiento con argatroban (9 mg/kg de peso) durante 12 semanas, en un modelo de cáncer de mama con células MDA-MB-468 en ratones desnudos hembras. De igual manera, ha sido reportado que dabigatran etexilato (45 mg/kg de peso) produce la reducción en un 50% del volumen tumoral en ratones BALB/c con cáncer de mama de células 4T1 (DeFeo y col., 2010). Asimismo, se ha observado que dabigatran produce *in vitro* inhibición de la proliferación de células MDA-MB231 de cáncer de mama humano inducida por trombina, así como reducción en la expresión de proteínas que regulan el ciclo celular y la angiogénesis (Vianello y col., 2016).

Existe un amplio rango de evidencia experimental que sugiere que la actividad de trombina promueve la progresión tumoral en diversos tipos de cáncer. En este sentido, ha sido demostrado que el bloqueo de la actividad de trombina en conjunto con la administración de otras drogas antineoplásicas potencia el efecto de reducción tumoral. Respecto a esto, se ha observado que el co-tratamiento con cisplatino y dabigatran etexilato, producen la reducción significativa del tamaño del tumor en el modelo cáncer de ovario murino, efecto mayor que el observado con las drogas administradas por separado (Alexander y col., 2016). De igual forma, se ha reportado *in vivo* que, el tratamiento con ciclofosfamida en conjunto con dabigatran etexilato, produce de manera sinérgica la inhibición del crecimiento del tumor en el modelo de cáncer murino con células 4T1 (Alexander y col., 2015).

Por otro lado, nuestros resultados mostraron la conformación de una masa tumoral multilobulada en los animales del grupo control en contraste a un tumor sólido definido en los animales del grupo tratado con dipetarudina (Figura 15B). Estos resultados comprueban que el bloqueo de la actividad de trombina reduce sus efectos sobre los procesos de proliferación celular y promoción de la progresión del crecimiento tumoral.

Con respecto a las principales complicaciones y causas de muerte en pacientes con cáncer de mama, ha sido descrito que la enfermedad metastásica es la principal causa de morbilidad y mortalidad en este tipo de cáncer (Weigelt y col., 2005). Nuestros resultados demuestran que el bloqueo de la actividad de trombina produce la reducción en la generación de metástasis. En este sentido, se ha demostrado la reducción significativa en el número de metástasis en órganos como los pulmones en un 36,6% y en el corazón en un 35,7% con respecto al grupo no tratado.

El cáncer de mama es considerado una de las patologías más comunes con mayor grado de malignidad, donde la etapa de metástasis es considerada la causa principal de los números de muertes (DeSantis y col., 2013). Asimismo, la metástasis de cáncer de mama ocurre con mayor frecuencia en la cadena regional de ganglios linfáticos, en los pulmones, hígado y huesos (Kennecke y col., 2010).

El papel de trombina en la generación de metástasis ha sido ampliamente estudiado. En este sentido, ha sido demostrado que trombina participa en una serie de pasos de los complejos mecanismos que conllevan a la generación de metástasis, principalmente en la migración celular, la evasión al sistema inmunitario de las células cancerígenas y en la invasión y la adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular (Snyder y Kessler, 2008).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que la inhibición del sistema de la coagulación puede de alguna manera modificar la progresión tumoral, y que el tratamiento con dipetarudina posiblemente inhibe la invasión en el modelo de cáncer de mama murino.

Un limitado número de estudios realizados con inhibidores de trombina, han reportado efecto sobre la generación espontánea de metástasis. En este sentido, se ha reportado que con el uso de argatroban (9 mg/kg de peso) *in vivo*, se produce la reducción en la generación de metástasis (Schulze y col., 2008).

En este estudio, no se observó la presencia de metástasis en el hígado, en el bazo, ni en el cerebro, sin embargo, en el caso del bazo, hallamos esplenomegalia en todos los animales de los dos grupos experimentales. En este sentido, ha sido reportado para el modelo de cáncer de mama de células 4T1 derivadas de carcinoma mamario murino que se produce una reacción leucemoide con granulocitosis y esplenomegalia (Thomas y col., 1985), condición conocida como síndrome paraneoplásico. Esta reacción se caracteriza por hiperplasia de la médula ósea, granulocitosis de rápida evolución que ocurre sin linfopenia significativa y esplenomegalia causada por infiltrados granulocíticos masivos. En algunos tipos de cáncer humanos, se ha sugerido que la reacción leucemoide se asocia con un mal pronóstico (Schniewind y col., 2005). En algunos casos, este síndrome paraneoplásico ha sido atribuido a la producción de tumores de factores estimulantes de colonias mieloides (DuPre'y Hunter Jr., 2007). En este particular, no ha sido reportada asociación aparente entre trombina y los factores estimulantes de colonias mieloides, lo que permite establecer relación con los hallazgos obtenidos, los cuales no reportan diferencias entre peso y tamaño de los bazos entre los grupos experimentales.

En el presente estudio, se demostró que el tratamiento con dipetarudina produce la reducción significativa en el número de ganglios axilares y cervicales invadidos y metastásicos, sin diferencia estadística en el número de ganglios paravertebrales presentes.

En este sentido, ha sido reportado que el uso de anticoagulantes específicos tales como el argatroban producen in vivo disminución en la invasión y metástasis de ganglios linfáticos en cáncer de mama de células MDA-MB-468 (DeFeo y col., 2010).

Efecto de la dipetarudina sobre la formación de complejos trombina-antitrombina

La relación entre el cáncer y la coagulación es objeto de investigación ya que se ha determinado una relación entre el tumor y la trombosis. Además, la alteración en la coagulación puede ser el primer síntoma en la malignidad.

En el presente estudio se reportó que existen altos niveles de formación de complejos trombina-antitrombina en los animales del grupo de cáncer de mama, lo que sugiere activación del sistema de coagulación. Asimismo, se observó reducción en los niveles de formación en el grupo de animales tratados con el inhibidor de trombina la dipetarudina, lo que indica, que el tratamiento con dipetarudina reduce el estado de hipercoagulabilidad en el modelo de cáncer ensayado y sugiere menor probabilidad de presencia de eventos trombóticos. En este sentido, se ha determinado que los eventos trombóticos y hemorrágicos son las causas más comunes de complicaciones y de muertes en pacientes con cáncer (Horton, 2005).

Algunos tumores estimulan la cascada de la coagulación y producen sustancias procoagulantes. Estas sustancias producen una respuesta inflamatoria y la inflamación afecta a las células tumorales para producir sustancias procoagulantes (De Cicco, 2004).

Efecto de la dipetarudina sobre los niveles de fibrinógeno

La acumulación de fibrinógeno junto con otras glicoproteínas adhesivas, sobre la matriz extracelular (MEC) sirve como soporte que favorece la unión de factores de crecimiento y promueve las respuestas celulares de adhesión, proliferación y migración durante la angiogénesis y el crecimiento de células tumorales (Simpson-Haidaris y Rybarczyk, 2001). Asimismo, existe evidencia que sugiere que trombina puede estimular la progresión tumoral de forma indirecta, a través de la formación de fibrinógeno (Kołodziejczyk y col., 2013).

El presente estudio muestra que los niveles de fibrinógeno se incrementan de manera significativa en el grupo de animales con cáncer de mama, efecto que es reducido en el grupo de animales tratados con el inhibidor de trombina, la dipetarudina. En este sentido, ha sido demostrado que, en diferentes tipos de cáncer, los niveles elevados de fibrinógeno se encuentran asociados con aumento del volumen tumoral, invasión tumoral y metástasis a distancia, con preferencia a ganglios linfáticos (Yu y col., 2016). Además, la hiperfibrinogenemia es cada vez más reconocida como un importante factor de riesgo que influye en el desarrollo y el progreso del cáncer (Seebacher y col., 2010). Asimismo, los estudios en ratones deficientes de fibrinógeno demuestran directamente que el fibrinógeno desempeña un papel importante en la fisiopatología del cáncer y es un factor determinante del potencial metastásico (Palumbo y col., 2002).

Los resultados obtenidos indican que, efectivamente, se produce un estado de hipercoagulabilidad en el modelo propuesto, y que la inhibición de trombina, favorece la reducción de la hipercoagulabilidad, con lo que se reduce la generación de posibles eventos tromboembólicos, así como la reducción en la generación de metástasis.

Efecto de la dipetarudina sobre las modificaciones producidas por isquemia en la unión de albúmina a cobalto exógeno

La isquemia es un evento asociado al cáncer, principalmente como causa de procesos tromboembólicos (Naschitz y col., 1993). Por otro lado, la albumina modificada por isquemia (IMA) es un marcador descrito para patologías relacionadas con isquemia (Lippi col., 2006).

Particularmente, IMA es específicamente un marcador bioquímico de isquemia en los síndromes coronarios agudos (Sbarouni y col., 2011). Sin embargo, en este estudio se demostró que, el cáncer de mama produce un incremento significativo de los niveles de IMA en el suero de

los animales inoculados con células 4T1, valores que fueron reducidos luego del tratamiento con el inhibidor de trombina, la dipetarudina. Sin embargo, los valores obtenidos, son menores a los reportados en los casos de isquemia cardiaca. En este sentido, Bar-Or y col. (2000) reportaron previamente en estudios clínicos con un ensayo colorimétrico de unión de cobalto a la albúmina que, valores mayores a 0,4 ABSU (unidades de absorbancia) eran considerados positivos para isquemia, mientras que, valores iguales o menores a 0,4 ABSU, fueron considerados negativos para isquemia. Por lo que, en este estudio, no se demuestra la presencia de isquemia en el modelo de cáncer propuesto. Sin embargo, considerando que los valores obtenidos fueron mayores a los mostrados por los animales sin cáncer, es importante considerar a IMA como un marcador de interés clínico, específicamente como marcador bioquímico de estrés oxidativo, ya que, ha sido reportado que dentro de las diferentes causas que pueden ocasionar modificaciones estructurales del sitio de unión de la albúmina a los metales, está la generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno (Roy y col., 2006).

En este particular, ha sido demostrado el uso de IMA como marcador de estrés oxidativo en diversas patologías diferentes a las de origen cardiaco, tales como diabetes (Kurban y col., 2011), embarazo y pre-eclampsia (Üstün y col., 2011) y trastornos neurodegenerativos (Aydin y col., 2014), entre otros.

Por otro lado, ha sido demostrado que, el estrés oxidativo conjuntamente con los procesos inflamatorios, juegan un papel importante en los mecanismos fisiopatológicos del cáncer, principalmente por la alta tasa de generación de especies reactivas y radicales libres que pueden producir alteraciones a nivel celular en las diferentes etapas de carcinogénesis (Reuter y col., 2010).

En este sentido, en casos particulares de cáncer, como por ejemplo cáncer de próstata, ha sido demostrado que, existe asociación entre niveles aumentados de IMA y reducción de la capacidad antioxidativa frente a esta patología (Da Silveira y col., 2014). Asimismo, ha sido reportada la correlación entre un incremento en los niveles de IMA y diferentes especies reactivas, específicamente el malondialdehído (MDA), en pacientes con cáncer gástrico (Fidan y col., 2012), lo que sugiere un desbalance oxidación-antioxidación.

En los casos de cáncer mama, los resultados de IMA han permitido identificar los potenciales fármacos que pueden producir alteraciones en las funciones cardíacas, específicamente, se ha demostrado que existe asociación entre niveles aumentados de IMA y daño cardiaco en pacientes que han recibido tratamiento a largo plazo con la droga doxorubicina (Ma y col., 2013).

Por otro lado, la reducción de los niveles de IMA observados en el modelo propuesto, sugiere posible propiedad antioxidante de la dipetarudina frente a la progresión tumoral y generación de metástasis del cáncer de mama. En este sentido, ha sido reportado que, trombina produce en el cáncer disfunción en la respuesta celular endotelial, mediada por un incremento del índice de estrés oxidativo, lo que favorece el daño de la integridad endotelial (Houle y col., 2006)

Los resultados obtenidos sugieren que, el posible uso de manera coadyuvante de un inhibidor de trombina, como la dipetarudina, podría favorecer el equilibrio de la capacidad de respuesta antioxidante frente al cáncer de mama y disminuir las diferentes modificaciones a nivel celular producto de la alta tasa de generación de radicales libres y especies reactivas, así como las complicaciones observadas en la enfermedad de cáncer de mama. En este sentido, se ha demostrado que las células cancerígenas se encuentran constantemente expuestas a altos niveles

de especies reactivas de oxígeno las cuales podrían favorecer el proceso de carcinogénesis, mediado principalmente por daños a nivel del ADN (Hecht y col., 2016). En este particular, existe una asociación entre modificaciones oxidativas en el fibrinógeno y acumulación de fibrina que favorece la adhesión de las células tumorales y el potencial metastásico (Qiu y col., 2012).

CONCLUSIONES

- Estos resultados aportan nuevas evidencias sobre el papel de la trombina en los mecanismos que participan en la progresión del crecimiento tumoral, la invasión y metástasis en el cáncer de mama. Además, este estudio representa el primer reporte de actividad anti-tumoral *in vivo* de la dipetarudina.
- En este trabajo se demuestra que el tratamiento con el inhibidor directo de trombina, la dipetarudina, produce limitación en la progresión del volumen del tumor primario. Asimismo, la dipetarudina produce reducción en el número de metástasis espontánea en pulmón y corazón, así como reducción de presencia de ganglios linfáticos con invasión y metástasis.
- El tratamiento con dipetarudina produce cambios en los parámetros de la coagulación con reducción de la formación de complejos trombina anti-trombina y disminución de los niveles de fibrinógeno en el modelo de cáncer de mama murino, lo que puede contribuir en la disminución de eventos protrombóticos.
- Se demostró que la determinación de los niveles de IMA puede ser considerado un marcador del índice de estrés oxidativo en el cáncer de mama y que puede indicar posibles cambios en la función cardíaca. Por otra parte, se plantea la posible capacidad antioxidante del inhibidor de trombina, la dipetarudina.

RECOMENDACIONES

- Estos resultados sugieren que los inhibidores de trombina como dipetarudina pueden ser considerados como potenciales agentes terapéuticos en la reducción de la progresión y comportamiento invasivo del cáncer de mama.
- Se requiere de más estudios que permitan conocer mejor los posibles mecanismos de la dipetarudina responsables de las observaciones presentadas en este trabajo.
- Se requiere comprobar del uso de dipetarudina en conjunto con otras drogas con actividad anti-tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., Khan, A. U. 2017. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol. Res.* **50**: 33-55.
- Alexander, E. T., Minton, A. R., Hayes, C. S., Goss, A., Van Ryn, J., Gilmour, S. K. 2015. Thrombin inhibition and cyclophosphamide synergistically block tumor progression and metastasis. *Cancer Biology Ther.* **16(12)**: 1802-1811.
- Alexander, E. T., Minton, A. R., Peters, M. C., van Ryn, J., Gilmour, S. K. 2016. Thrombin inhibition and cisplatin block tumor progression in ovarian cancer by alleviating the immunosuppressive microenvironment. *Oncotarget.* **7(51)**: 85291.
- Aminoff, M. J. 2008. Neurology and General Medicine. Churchill Livingstone, Cuarta Edición, Filadelfia, P.A., E.U.A.
- Asanuma, K., Wakabayashi, H., Hayashi, T., Okuyama N., Seto, M., Matsumine, A., Kusuzaki, K. y colaboradores. 2004. Thrombin inhibitor, argatroban, prevents tumor cell migration and bone metastasis. *Oncology.* **67**: 166-173.
- Asanuma, K., Wakabayashi, H., Okamoto, T., Asanuma, Y., Akita, N., Yoshikawa, T., Hayashi, T. y colaboradores. 2012. The thrombin inhibitor, argatroban, inhibits breast cancer metastasis to bone. *Breast Cancer-Tokyo.* **20(3)**: 241-246.
- Aydin, O., Ellidag, H. Y., Eren, E., Kurtulus, F., Yaman, A., Yılmaz, N. 2014. Ischemia modified albumin is an indicator of oxidative stress in multiple sclerosis. *Biochem. Medica.* **24(3)**: 383-389.
- Barbosa, M. 2014. What is the Best Treatment for a Cancer Patient with Thrombosis?. *Clin. Med. Insights. Oncol.* **8**: 49-55.

- Bar-Or, D., Lau, E., Winkler, J. V. 2000. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J. Emerg. Med.* **19(4)**: 311-315.
- Bonow, O., Mann, D. L., Zipes, D. P., Libby, P. 2011. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Single Volume. Elsevier Saunders, Novena Edición, Filadelfia, P.A., E.U.A.
- Bose, P., Brockton, N. T., Dort, J. C. 2013. Head and neck cancer: from anatomy to biology. *Int. J. Cancer.* **133(9)**: 2013-2023.
- Boudes, P. F. 2006. The challenges of new drugs benefits and risks analysis: Lessons from the ximelagatran FDA Cardiovascular Advisory Committee. *Contemp. Clin. Trials.* **27(5)**: 432-440.
- Burstein, H. J., Krilov, L., Aragon-Ching, J. B., Baxter, N. N., Chiorean, E. G., Chow, W. A., De Groot, J. F. 2017. Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* **35**:1341-1367.
- Butenas, S. 2012. Tissue Factor Structure and Function. *Scientifica.* **2012**: 1-15.
- Caine, G. J., Stonelake P. S., Lip, G. Y., Kehoe, S. T. 2002. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia.* **4(6)**: 465-473.
- Chen, M. T., Sun, H. F., Zhao, Y., Fu, W. Y., Yang, L. P., Gao, S. P., Li, L. D. y colaboradores. 2017. Comparison of patterns and prognosis among distant metastatic breast cancer patients by age groups: a SEER population-based analysis. *Sci. Rep.* **7(9254)**: 1-8.

- Coussens, L. M., & Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. **420(6917)**: 860.
- Crawley, J. T., Zanardelli, S., Chion, C. K., Lane, D. A. 2007. The central role of thrombin in hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **5 (Suppl. 1)**: 95-101.
- Da Silveira, R. A., Hermes, C. L., Almeida, T. C., Bochi, G. V., De Bona, K. S., Moretto, M. B., Moresco, R. N. 2014. Ischemia-modified albumin and inflammatory biomarkers in patients with prostate cancer. *Clin. Lab.* **60(10)**: 1703-1708.
- Danckwardt, S., Hentze, M. W., Kulozik, A. E. 2013. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *J. Mol. Med.* **91(11)**: 1257-1271.
- Dearborn, J. L., Urrutia, V. C., Zeiler, S. R. 2014. Stroke and Cancer-A Complicated Relationship. *J. Neurol. Transl. Neurosci.* **2(1)**: 1039-1055.
- De Cicco, M. 2004. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **50(3)**: 187-196.
- DeFeo, K., Hayes, C., Chernick, M., Van Ryn, J., Gilmour, S. K. 2010. Use of dabigatran etexilate to reduce breast cancer progression. *Cancer Biol. Ther.* **10(10)**: 1001-1008.
- DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L., & Jemal, A. 2014. Breast cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians, **64(1)**, 52-62.
- Di Nisio, M., Middeldorp, S., Büller, H. R. 2005. Direct Thrombin Inhibitors. *New. Engl. J. Med.* **353(10)**: 1028-1040.
- Donepudi M.S., Kondapalli K., Amos S.J., Venkanteshan P. 2014. Breast cancer statistics and markers. *J. Cancer Res. Ther.* **10(3)**: 506-511.

- DuPre' S. A., Hunter Jr., K. W. 2007. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp. Mol. Pathol.* **82(1)**: 12-24.
- Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A. 2013. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *J Thromb. Haemost.* **11**: 223-233.
- Falanga, A., Schieppati, F., Russo, D. 2015. Cancer Tissue Procoagulant Mechanisms and the Hypercoagulable State of Patients with Cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* **41 (7)**: 756-764.
- Falanga, A., Russo, L., Milesi, V., Vignoli, A. 2017. Mechanisms and risk factors of thrombosis in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **118**: 79-83.
- Fernández, A., Reigosa, A. 2015. Riesgo de Cáncer de Mama en Mujeres con Patología Mamaria Benigna. *Comunidad y Salud.* **13(1)**: 78-86.
- Fidan, E., Mentese, A., Kavgaci, H., Orem, A., Fidan, S., Uzun, A., Ozdemir, F y colaboradores. 2012. Increased ischemia-modified albumin levels in patients with gastric cancer. *Neoplasma.* **59(4)**: 393-397.
- Flores-Rivera, O. I., Ramírez-Morales, K., Meza-Márquez, J. M., Nava-López, J. A. 2014. Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología.* **37(2)**: S382-S386.
- Franchini, M., Mannucci, P. M. 2012. Thrombin and Cancer: From Molecular Basis to Therapeutic Implications. *Semin. Thromb. Hemost.* **38**: 95-101.
- Gandhi, V., Mehta, K., Grover, J., Pathak, S., Aggarwal, B. B. 2015. Multi-Targeted Approach to Treatment of Cancer. Springer, Primera Edición, Nueva York, E. U. A.

- García-López, M. T., Gutiérrez-Rodríguez, M., Herranz, R. 2010. Thrombin-Activated Receptors: Promising Targets for Cancer Therapy?. *Curr. Med. Chem.* **17(2)**: 109-128.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* **140(6)**: 883-899.
- Guan, X. 2015. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* **5(5)**: 402-418.
- Guo, R.R., Liu, Y., Lu, W. L., Zhao, J. H., Wang, X. Q., Zhang, H., Wang, J. C. y colaboradores. 2008. A recombinant peptide, hirudin, potentiates the inhibitory effects of stealthy liposomal vinblastine on the growth and metastasis of melanoma. *Biol. Pharm. Bull.* **31(4)**: 696-702.
- Han, N., Jin, K., He, K., Cao, J., Teng, L. 2011. Protease-activated receptors in cancer: A systematic review. *Oncol. Lett.* **2(4)**: 599-608.
- Hanahan, D., Weinberg, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* **144**: 646-674.
- Hecht, F., Pessoa, C. F., Gentile, L. B., Rosenthal, D., Carvalho, D. P., Fortunato, R. S. 2016. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biol.* **37(4)**: 4281-4291.
- Höckel, M., Vaupel, P. 2001. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *J. Natl. Cancer I.* **93(4)**: 266-276.
- Horton, J. 2005. Venous thrombotic events in cancer: the bottom line. *Cancer Control.* **12(3_suppl)**: 31-37.

- Houle, F., Huot, J. 2006. Dysregulation of the endothelial cellular response to oxidative stress in cancer. *Mol. Carcinogen.* **45(6)**: 362-367.
- Hu, L., Lee, M., Campbell, W., Pérez-Soler, R., Karparkin, S. 2004. Role of endogenous thrombin in tumor implantation, seeding, and spontaneous metastasis. *Blood.* **104(9)**: 2746-2751.
- Hunter, K. W., Crawford, N. P., Alsarraj, J. 2008. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res.* **10(1)**: S2.
- Ikushima, S., Ono, R., Fukuda, K., Sakayori, M., Awano, M., Kondo, K. 2016. Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **46(3)**: 204-208.
- Jiang, J., Tang, Y. L., Liang, X. H. 2011. EMT: A new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol. Ther.* **11(8)**: 714-723.
- Jin, W., Kim, G. M., Kim, M. S., Lim, M. H., Yun, C., Jeong, J., Nam, J. S. y colaboradores. 2010. TrkC plays an essential role in breast tumor growth and metastasis. *Carcinogenesis.* **31(11)**: 1939-1947.
- Jin, X., Mu, P. 2015. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast cancer: basic and clinical research.* **9(S1)**: 23-34.
- Kell, D. B., Pretorius, E. 2015. The simultaneous occurrence of both hypercoagulability and hypofibrinolysis in blood and serum during systemic inflammation, and the roles of iron and fibrin(ogen). *Integr. Biol.* **7(1)**: 24-52.
- Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C. U., Voduc, D., Speers, C. H., Nielsen, T. O. y colaboradores. 2010. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J.*

Clin. Oncol. **28(20)**: 3271-3277.

- Khalil, J., Bensaid, B., Elkacemi, H., Afif, M., Bensaid, Y., Kebdani, T., Benjaafar, N. 2015. Venous thromboembolism in cancer patients: an underestimated major health problem. *World J. Surg. Oncol.* **13(1)**: 204-220.
- Kim, S. G., Hong, J. M., Kim, H. Y., Lee, J., Chung, P. W., Park, K. Y., Kim, G. M. y colaboradores. 2010. Ischemic Stroke in Cancer Patients With and Without Conventional Mechanisms: A Multicenter Study in Korea. *Stroke.* **41(4)**:798-801.
- Kim, K., Lee, J. H. 2014. Risk Factors and Biomarkers of Ischemic Stroke in Cancer Patients. *J. Stroke.* **16(2)**: 91-96.
- Kirane, A., Ludwig, K. F., Sorrelle, N., Haaland, G., Sandal, T., Ranaweera, R., Toombs, J. E. y colaboradores. 2015. Warfarin Blocks Gas6-Mediated Axl Activation Required for Pancreatic Cancer Epithelial Plasticity and Metastasis. *Cancer Res.* **75(18)**: 3699-3705.
- Kołodziejczyk, J., Ponczek, M. B. 2013. The role of fibrinogen, fibrin and fibrin (ogen) degradation products (FDPs) in tumor progression. *Contemp. Oncol.* **17(2)**: 113.
- Kurban, S., Mehmetoglu, I., Yerlikaya, H. F., Gönen, S., Erdem, S. 2011. Effect of chronic regular exercise on serum ischemia-modified albumin levels and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Endocr. Res.* **36(3)**: 116-123.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., Weinberg, R. A. 2017. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell.* **168(4)**: 670-691.
- La Thangue, N. B., Bandara, L. R. 2002. Targets for Cancer Chemotherapy: Transcription Factors and Other Nuclear Proteins. Humana Press, Primera Edición,

Nueva York, E.U.A.

- Lee, C. J., Ansell, J. E. 2011. Direct thrombin inhibitors. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **72(4)**: 581-592.
- Lee, E., Eom, J. E., Jeon, K. H., Kim, T. H., Kim, E., Jhon, G. J., Kwon, Y. 2014. Evaluation of albumin structural modifications through cobalt-albumin binding (CAB) assay. *J. Pharmaceut. Biomed.* **91**: 17-23.
- Lee, M. J., Chung, J.-W., Ahn, M.-J., Kim, S., Seok, J. M., Jang, H. M., Kim, G. -M. y colaboradores. 2017. Hypercoagulability and Mortality of Patients with Stroke and Active Cancer: The OASIS-CANCER study. *J. Stroke.* **19(1)**: 77-87.
- Lewis, C., Murdoch, C. 2005. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am. J. Pathol.* **167(3)**: 627-635.
- Lieberman, M., Marks, A. D. 2013. Marks' Basic Medical Biochemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Cuarta Edición, Filadelfia, P.A., E.U.A.
- Lippi, G., Montagnana, M., Guidi, G. C. 2006. Albumin cobalt binding and ischemia modified albumin generation: an endogenous response to ischemia?. *Int. J. Cardiol.* **108(3)**: 410-411.
- López, M., Mende, K., Steinmetzer, T., Nowak, G. 2003. Cloning, purification and biochemical characterization of dipetarudin, a new chimeric thrombin inhibitor. *J. Chromatogr. B.* **786(1-2)**: 73-80.
- López, M., Nowak, G. 2004. Special pharmacokinetics of dipetarudin suggests a potential antitumor activity of this thrombin inhibitor. *Anti-Cancer Drug.* **15**: 145-49.

- Ma, Y., Kang, W., Bao, Y., Jiao, F., Ma, Y. 2013. Clinical significance of ischemia-modified albumin in the diagnosis of doxorubicin-induced myocardial injury in breast cancer patients. *PloS one*, **8(11)**: e79426.
- Mackman, N. 2009. The Role of Tissue Factor and Factor VIIa in Hemostasis. *Anesth. Analg.* **108 (5)**: 1447-1452.
- Martínez-Martínez, M., Cazorla-García, R., Rodríguez de Antonio, L. A., Martínez-Sánchez, P. Fuentes, B., Díez-Tejedor, E. 2010. Estados de hipercoagulabilidad e ictus isquémico en pacientes jóvenes. *Neurología.* **25(6)**: 343-348.
- Matijevic, N., Wu, K. K. 2006. Hypercoagulable States and Strokes. *Curr. Atheroscler. Rep.* **8**: 324-329.
- Mehrgou, A. Akouchekian, M. 2016. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Med. J. Islam. Repub. Iran.* **30(369)**: 1-12.
- Mi, Z., Guo, H., Wai, P. Y., Gao, C., Wei, J., Kuo, P. C. 2004. Differential Osteopontin Expression in Phenotypically Distinct Subclones of Murine Breast Cancer Cells Mediates Metastatic Behavior. *J. Biol. Chem.* **279(45)**: 46659-46667.
- Mitchell, M. G. 2016. *Cell Biology: Translational Impact in Cancer Biology and Bioinformatics*. Academic Press, Primera Edición, San Diego, California, E.U.A.
- Mosadegh, B., Dabiri, B. E., Lockett, M. R., Derda, R., Campbell, P., Parker, K. K., Whitesides, G. M. 2014. Three-Dimensional Paper-Based Model for Cardiac Ischemia. *Adv. Healthc. Mater.* **3(7)**: 1036-1043.
- Moreno, P. R., del Portillo, J. H. 2016. Isquemia miocárdica: conceptos básicos, diagnóstico e implicaciones clínicas. Primera parte. *R.C.C.* **23(5)**: 403-409.

- Naschitz, J. E., Yeshurun, D., Lev, L. M. 1993. Thromboembolism in cancer. Changing trends. *Cancer*. **71(4)**: 1384-1390.
- Ng, Z. X., Ong, M. S., Jegadeesan, T., Deng, S., Yap, C. T. 2017. Breast Cancer: Exploring the Facts and Holistic Needs during and beyond Treatment. *Healthcare*. **5(2)**: 26-36.
- Nierodzik, M. L., Plotkin, A., Kajumo, F., Karpatkin, S. 1991. Thrombin Stimulates Tumor-Platelet Adhesion In Vitro and Metastasis In Vivo. *J. gClin. Invest.* **87(1)**: 229-236.
- Nierodzik, M. L., Karpatkin, S. 2006. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*. **10(5)**: 355-362.
- Niers, T. M., Brüggemann, L. W., Klerk, C. P., Muller, F. J., Buckle, T., Reitsma, P. H., Richel, D. J. y colaboradores. 2009. Differential effects of anticoagulants on tumor development of mouse cancer cell lines B16, K1735 and CT26 in lung. *Clin. Exp Metastasis*. **26(3)**: 171-178.
- O'Rorke, M. A., Murray, L. J., Hughes, C. M., Cantwell, M. M., Cardwell, C. R. 2015. The effect of warfarin therapy on breast, colorectal, lung, and prostate cancer survival: a population-based cohort study using the Clinical Practice Research Datalink. *Cancer Cause. Control*. **26**: 355-366.
- Palumbo, J. S., Potter, J. M., Kaplan, L. S., Talmage, K., Jackson, D. G., Degen, J. L. 2002. Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Cancer Res*. **62(23)**: 6966-6972.

- Patnaik, M. M., Moll, S. 2008. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia*. **14**: 1229-1239.
- Pera, C. 1998. El cuerpo herido: un diccionario filosófico de la cirugía. Edicions de la Universitat de Barcelona, Primera Edición, Barcelona, España.
- Perzborn, E., Roehrig, S., Straub, A., Kubitza, D., Misselwitz, F. 2011. The discovery and development of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**: 61-75.
- Polyak, K. 2011. Heterogeneity in breast cancer. *J. Clin. Invest.* **121(10)**: 3786-3788.
- Proskuryakov, S. Y., Gabai, V. L. 2010. Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr. Pharm. Design.* **16(1)**: 56-68.
- Pulaski, B. A., Ostrand-Rosenberg, S. 2000. Current Protocols in Immunology. John Wiley and Sons, Nueva York, E.U.A.
- Qiu, J., Yu, Y., Fu, Y., Ye, F., Xie, X., Lu, W. 2012. Preoperative plasma fibrinogen, platelet count and prognosis in epithelial ovarian cancer. *J. Obstet. and Gynaecol. Re.* **38(4)**: 651-657.
- Rahman, M., Mohammed, S. 2015. Breast cancer metastasis and the lymphatic system (Review). *Oncol. Lett.* **10**: 1233-1239.
- Ratnoff, O., Menzie, C. 1951. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J. Lab. Clin. Med.* **37**: 516-520.
- Redig, A. J., McAllister, S. S. 2013. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J. Intern. Med.* **274 (2)**: 113-126.

- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radical Bio Med.* **49(11)**: 1603-1616.
- Rickles, F. R., Patierno, S., Fernández, P. M. 2003. Tissue Factor, Thrombin, and Cancer. *Chest.* **124(3)**: 58S-68S.
- Roy, D., Quiles, J., Gaze, D. C., Collinson, P., Kaski, J. C., Baxter, G. F. 2006. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart.* **92(1)**: 113-114.
- Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J. A., Majsterek, I. 2016. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr. Mol. Med.* **16(6)**: 533-544.
- Rubin, E., Reisner, H. M. 2009. Essentials of Rubin's Pathology. Lippincot Williams & Wilkins, Quinta Edición, Filadelfia, Pensilvania, E.U.A.
- Sanford, D., Naidu, A., Alizadeh, N., Lazo-Langner, A. 2014. The effect of low molecular weight heparin on survival in cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J. Thromb. Haemost.* **12(7)**: 1076-1085.
- Saxena, M., Christofori, G. 2013. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Mol Oncol.* **7(2)**: 283-296.
- Sbarouni, E., Georgiadou, P., Voudris, V. 2011. Ischemia modified albumin changes - review and clinical implications. *Clin. Chem. Lab. Med.* **49(2)**: 177-184.
- Schniewind, B., Christgen, M., Hauschild, A., Kurdow, R., Kalthoff, H., Klomp, H. J. 2005. Paraneoplastic leukemoid reaction and rapid progression in a patient with

malignant melanoma: establishment of KT293, a novel G-CSF-secreting melanoma cell line. *Cancer Biol. Ther.* **4(1)**: 30-34.

- Schulze, E. B., Hedley, B. D., Goodale, D., Postenka, C. O., Al-Katib, W., Tuck, A. B., Chambers, A. F. y colaboradores. 2008. The thrombin inhibitor Argatroban reduces breast cancer malignancy and metástasis via osteopontin-dependent and osteopontin-independent mechanisms. *Breast. Cancer. Res. Treat.* **112**: 243-254.
- Schwarzbach, C. J., Schaefer, A., Ebert, A., Held, V., Bolognese, M., Kablau, M., Hennerici, M. G. y colaboradores. 2012. Stroke and Cancer: The importance of cancer-associated hypercoagulation as a possible stroke etiology. *Stroke.* **43(11)**: 3029-3034.
- Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G., Yu, Y. 2012. Breast Cancer Metastasis. *Cancer Genom. Proteom.* **9**: 311-320.
- Seebacher, V., Polterauer, S., Grimm, C., Husslein, H., Leipold, H., Hefler-Frischmuth, Tempfer, C. y colaboradores. 2010. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial. *Brit. J. Cancer.* **102(6)**: 952-956.
- Semenza, G. L. 2016. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1863(3)**: 382-391.
- Seok, J. M., Kim, S. G., Kim, J. W., Chung, C. S., Kim, G. M., Lee, K. H., Bang, O. Y. 2010. Coagulopathy and Embolic Signal in Cancer Patients with Ischemic Stroke. *Ann. Neurol.* **68**: 213-219.
- Seyfried, T. N., Huysentruyt, L. 2013. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* **18(1-2)**: 43-73.
- Seyfried, T. N., Shelton, L. M. 2010. Cancer as a metabolic disease. *Nutr. Metab.* **7(1)**: 1-22.

- Shahrzad, S., Bertrand, K., Minhas, K., Coomber, B. L. 2007. Induction of DNA Hypomethylation by Tumor Hypoxia. *Epigenetics*. **2(2)**: 119-125.
- Shi, K., Damhofer, H., Daalhuisen, J., ten Brink, M., Richel, D. J., Spek, C. A. 2017. Dabigatran Potentiates Gemcitabine-Induced Growth Inhibition of Pancreatic Cancer in Mice. *Mol. Med.* **23**: 13-23.
- Siller-Matula, J. M., Schwameis, M., Blann, A., Mannhalter, C., Jilma, B. 2011. Thrombin as a multi-functional enzyme. *Thromb. Haemostasis*. **106(6)**: 1020-1033.
- Simpson-Haidaris, P. J., Rybarczyk, B. 2001. Tumors and fibrinogen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936(1)**: 406-425.
- Snyder, K. M., Kessler, C. M. 2008. The pivotal role of thrombin in cancer biology and tumorigenesis. *Semin Thromb. Hemost.* **34(8)**: 734-741.
- Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B., Trejo, J. 2010. Signal transduction by protease-activated receptors. *Brit. J. Pharmacol.* **160 (2)**: 191-203.
- Spek, C. A., Versteeg, H. H., Borensztajn, K. S. 2015. Anticoagulant therapy of cancer patients: Will patient selection increase overall survival? *Thromb. Haemostasis*. **114 (03)**: 530-536.
- Suero-Abreu, G. A., Cheng, J. Z., Then, R. K. 2017. Multiple recurrent ischaemic strokes in a patient with cancer: is there a role for the initiation of anticoagulation therapy for secondary stroke prevention?. *BMJ Case Rep.* 1-6.
- Taylor, L. M., Hauty, M. G., Edwards, J. M., Porter, J. M. 1987. Digital ischemia as a manifestation of malignancy. *Ann. Surg.* **206(1)**: 62-68.
- Theberge, I., Bowdridge, J., Forgie, M. A., Carrier, M., Louzada, M., Siquiera, L. Rhodes, M. y colaboradores. 2017. Rivaroxaban shows promise as effective therapy for

cancer patients with venous thromboembolic disease. *Thromb. Res.* **152**: 4-6.

- Thomas, E., Smith, D. C., Lee, M. Y., Rosse, C. 1985. Induction of granulocytic hyperplasia, thymic atrophy, and hypercalcemia by a selected subpopulation of a murine mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* **45(11 Part 2)**: 5840-5844.
- Thomson, A. K., Heyworth, J. S., Girschik, J., Slevin T., Saunders, C., Fritschi, L. 2014. Beliefs and perceptions about the causes of breast cancer: a case-control study. *BMC research notes.* **7(1)**: 558-565.
- Tomasetti, C., Li, L., Vogelstein, R. 2017. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science.* **355(6331)**: 1330-1334.
- Tomayko, M. M., Reynolds, C. P. 1989. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemoth. Pharm.* **24**: 148-154.
- Üstün, Y., Engin-Üstün, Y., Öztürk, Ö., Alanbay, I., Yaman, H. 2011. Ischemia-modified albumin as an oxidative stress marker in preeclampsia. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **24(3)**: 418-421.
- Vianello, F., Sambado, L., Goss, A., Fabris, F., Prandoni, P. 2016. Dabigatran antagonizes growth, cell-cycle progression, migration, and endothelial tube formation induced by thrombin in breast and glioblastoma cell lines. *Cancer Med-US.* **5(10)**: 2886-2898.
- Vicci, H., Navarro, M. P., Eblen-Zajjur, A. 2015. La trombina más allá de la coagulación (Revisión). *Vitae.* **63**: 1-13.
- Wang, E., Zaman, N., Mcgee, S., Milanese, J. S., Masoudi-Nejad, A., O'Connor, M.

2014. Predictive genomics: A cancer hallmark network framework for predicting tumor clinical phenotypes using genome sequencing data. *Semin. Cancer Biol.* **30**: 1-9.

- Weigelt, B., Peterse, J. L., Van't Veer, L. J. 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer.* **5(8)**: 591-602.
- Wojtukiewicz, M. Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S. C., Honn, K. V. 2015. Protease-activated receptors (PARs)—biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Metast. Rev.* **34**: 775-796.
- Wojtukiewicz, M. Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S. C., Honn, K. V. 2016. Thrombin-unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **35(2)**: 213-233.
- Wu, Y., Sarkissyan, M., Vadgama, J. V. 2016. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **5(2)**: 1-18.
- Yu, X., Hu, F., Yao, Q., Li, C., Zhang, H., Xue, Y. 2016. Serum fibrinogen levels are positively correlated with advanced tumor stage and poor survival in patients with gastric cancer undergoing gastrectomy: a large cohort retrospective study. *BMC cancer.* **16(1)**: 480.
- Yuan, T. C., Lin, M. F. 2004. Protease-Activated Receptor 1: A Role in Prostate Cancer Metastasis. *Clin. Prostate Cancer.* **3(3)**: 189-191.
- Yuan, L., Liu, X. 2015. Platelets are associated with xenograft tumor growth and the clinical malignancy of ovarian cancer through an angiogenesis-dependent mechanism. *Mol Med. Rep.* **11(4)**: 2449-2458.

- Zigler, M., Kamiya, T., Brantley, E. C., Villares, G. J., Bar-Eli, M. 2011. PAR-1 and Thrombin: The Ties that Bind the Microenvironment to Melanoma Metastasis. *Cancer Res.* **71(21)**: 6561-6566.

Consultas en línea:

- National Cancer Institute. 2018.
<https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html> [Consulta: 11 de Febrero de 2018]
- Instituto Nacional del Cáncer. 2017.
<https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq> [Consulta: 05 de Octubre de 2017]
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de Mortalidad 2013.
<https://www.ovsalud.org/descargas/publicaciones/documentos-oficiales/Anuario-Mortalidad-2013.pdf> [Consulta: 10 de Febrero de 2018]
- World Health Organization. 2018. Cancer.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [Consulta: 10 de Febrero de 2018].

ANEXOS

Carta de aprobación de Bioética



Carretera Panamericana, Km 11, Altos de Pipe.
Teléfonos: (0058) 212 504.11.11 - <http://www.ivic.gov.ve>
Despacho del Director
Rif. G-20004206-0

DIR-0030/1582/2017

Altos de Pipe, 17 de enero de 2017

Ciudadana
Mercedes López
Centro de Biofísica y Bioquímica
Presente.-

Estimada Dra. López:

Cordialmente me dirijo a usted a fin de hacer de su conocimiento que el Consejo Directivo en su sesión 1582 de fecha 16 de enero del año en curso, consideró y aprobó la revisión del proyecto: "EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE TROMBINA SOBRE CRECIMIENTO TUMORAL EN DOS MODELOS DE CÁNCER DE RATONES" del cual son responsables su persona y el Dr. Ivan Bravo, cumpliendo como tal, con las normas de bioética requeridas en la investigación de animales.

Sin más a que referirme, le saluda

Atentamente,


Alexander Briceño Villarreal
Subdirector IVIC

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
DESPECHO DEL DIRECTOR
INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Providencia Administrativa N° IVIC/142012 de fecha 15 de julio de 2013
publicada en Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela Nro. 39988 de fecha 17 de agosto de 2013.

Ab/vg
C.C. Dra. Maricna Hidaigo, Centro de Microbiología y Biología Celular
Dra. Iván Bravo, Centro de Biofísica y Bioquímica